

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

MATRICES À BASE DE CARBOXYMÉTHYL AMIDON POUR
DES FORMULATIONS PHARMACEUTIQUES D'AGENTS
BIOACTIFS À ADMINISTRATION ORALE

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR
CARMEN CALINESCU

FÉVRIER 2011

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

Remerciements

Je souhaite remercier mon directeur de recherche, le professeur Mircea Alexandru Mateescu, pour son accueil dans son laboratoire, son soutien scientifique et pour la confiance qu'il a eu en moi tout au cours de mon doctorat. Je voudrais aussi remercier le groupe de recherche du Dr. John Morris Fairbrother, ainsi qu'aux professeurs Bruno Mondovi et Rodolfo Federico pour leur collaboration à la réalisation des articles sur les *fimbriae* F4 et la diamine oxydase. Je tiens à remercier Dr. Alain Richard (Valeo) pour l'intérêt sur notre technologie du carboxyméthyl amidon. Je remercie tous mes collègues de laboratoire, ainsi que le personnel du Département de chimie de l'UQAM.

Je tiens à remercier le CRSNG (bourse d'études supérieures du Canada) et FARE pour les bourses qu'ils m'ont octroyées pendant cette période, sans lesquelles je n'aurais pas pu continuer mes études. Je suis reconnaissante à la compagnie Boehringer Ingelheim pour la remise du *prix d'excellence Boehringer Ingelheim 2008-2009*.

Je voudrais dédier cette thèse à toute ma famille, et surtout à mon enfant, Victor R. Calinescu, qui a vu le jour dans ma première année de doctorat et a été à côté de moi durant le long chemin de mes études avancées: deux projets très importants et ambitieux de ma vie que j'ai eu la chance de réaliser. Plus tard, quand tu seras grand, tu vas comprendre peut-être plus pour quoi ta maman a été ainsi occupée. Je remercie aussi à mon mari, Catalin M. Calinescu, qui a cru dans ma réussite et qui m'a toujours encouragé de commencer ce doctorat et...de le finir. Et pas dernièrement, je n'oublierai jamais les encouragements de mes amis, Anda et Radu Braniste, et leur soutien moral durant les épreuves que j'ai eu à traverser.

Un gros Merci à tous.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-------|
| LISTE DES FIGURES | ix |
| LISTE DES TABLEAUX | xvi |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | xvii |
| INTRODUCTION SOMMAIRE DE L'ENSEMBLE DE LA THÈSE | xxi |
| RÉSUMÉ | xxiii |
| PARTIE I - INTRODUCTION | 1 |
| CHAPITRE I L'AMIDON, LE CHITOSANE ET LEURS DÉRIVÉS COMME EXCIPIENTS PHARMACEUTIQUES | 2 |
| 1.1 L'amidon – structure et propriétés | 2 |
| 1.1.1 La structure de l'amidon, de l'amylose et de l'amylopectine | 2 |
| 1.1.2 Les caractéristiques physiques de l'amidon | 8 |
| 1.1.2.1 La solubilité | 8 |
| 1.1.2.2 La gélatinisation | 8 |
| 1.1.2.3 La gélification | 9 |
| 1.1.2.4 La rétrogradation | 9 |
| 1.2 Le chitosane – origine, structure et propriétés | 10 |
| 1.2.1 L'origine et la structure du chitosane | 10 |
| 1.2.2 Les propriétés du chitosane | 11 |
| 1.2.2.1 Le comportement dans un milieu aqueux | 11 |
| 1.2.2.2 Les propriétés physico-chimiques | 12 |
| 1.2.2.3 Les propriétés complexantes | 13 |

| | |
|---|----|
| 1.2.2.4 Activité antibactérienne | 15 |
| 1.3 Modifications chimiques de l'amidon et du chitosane | 16 |
| 1.3.1 Dérivés d'amidon | 16 |
| 1.3.2 Dérivés de chitosane | 20 |
| 1.4 L'amidon et le chitosane dans le domaine pharmaceutique et médical ... | 21 |
| 1.4.1 L'amidon | 21 |
| 1.4.2 Le chitosane | 22 |
| CHAPITRE II | |
| SYSTÈMES DE TRANSPORT ET DE LIVRAISON DES MÉDICAMENTS ET DES AGENTS BIOACTIFS ADMINISTRABLES PAR VOIE ORALE ... | 25 |
| 2.1 La libération contrôlée des agents actifs | 27 |
| 2.1.1 Formulations pharmaceutiques à libération contrôlée | 27 |
| 2.1.1.1 Systèmes à libération contrôlée par gonflement | 27 |
| 2.1.1.2 Systèmes à libération contrôlée par diffusion | 28 |
| 2.1.1.3 Systèmes à libération contrôlée par érosion | 29 |
| 2.1.1.4 Systèmes osmotiques à libération contrôlée | 31 |
| 2.1.2 La cinétique de libération des médicaments | 33 |
| 2.2 Le relargage ciblé des agents actifs | 33 |
| 2.2.1 La libération des principes actifs au niveau de l'intestin | 34 |
| 2.2.1.1 Systèmes à libération dépendante de pH | 34 |
| 2.2.1.2 Systèmes à libération dépendante de temps | 36 |
| 2.2.1.3 Systèmes à libération dépendante de pression | 37 |
| 2.2.1.4 Systèmes à libération dépendante de la présence de la microflore intestinale | 37 |
| 2.2.2 Polymères utilisés comme systèmes de transport pour la libération des principes actifs au niveau de l'intestin | 41 |
| CHAPITRE III | |
| AGENTS BIOACTIFS ADMINISTRABLES PAR LA VOIE ORALE | 43 |
| 3.1 Vaccins | 43 |

| | |
|---|----|
| 3.1.1 Généralités – vaccins pour la prévention des maladies entériques | 43 |
| 3.1.2 La diarrhée post-sevrage chez le porc | 44 |
| 3.1.2.1 Les agents pathogènes responsables d'infections intestinales | 44 |
| 3.1.2.2 La toxicogénèse des bactéries d' <i>Escherichia coli</i> | 46 |
| 3.1.3 Vaccins sous-unitaires à base des <i>fimbriae</i> F4 contre la diarrhée post-sevrage chez le porc | 48 |
| 3.1.3.1 La morphologie des <i>fimbriae</i> F4 | 48 |
| 3.1.3.2 La structure des <i>fimbriae</i> F4 | 49 |
| 3.1.3.3 Le rôle des <i>fimbriae</i> F4 dans l'induction d'une réponse immunitaire | 50 |
| 3.1.4 Vaccins bactériens à base d' <i>Escherichia coli</i> (F4 ⁺) contre la diarrhée post-sevrage chez le porc | 51 |
| 3.2 Probiotiques | 53 |
| 3.2.1 Probiotiques – bactéries bénéfiques pour la santé | 53 |
| 3.2.2 Prébiotiques | 54 |
| 3.2.3 Synbiotiques | 54 |
| 3.2.4 La microflore intestinale | 55 |
| 3.2.5 Les bactéries lactiques | 57 |
| 3.2.5.1 Les effets bénéfiques des bactéries lactiques sur la santé humaine et leurs mécanismes d'action | 58 |
| 3.2.6 Utilisation des probiotiques pour contrôler les maladies inflammatoires de l'intestin | 62 |
| 3.3 Métallo-enzymes avec potentiel thérapeutique | 64 |
| 3.3.1 Les amine oxydases – généralités | 64 |
| 3.3.1.1 La structure des amine oxydases à cuivre | 64 |
| 3.3.1.2 Le mécanisme catalytique des amine oxydases à cuivre | 66 |
| 3.3.1.3 La diamine oxydase (histaminase) | 69 |
| 3.3.1.4 L'implication de la diamine oxydase dans le métabolisme de l'histamine | 72 |
| 3.3.1.5 L'intolérance à l'histamine | 74 |

| | |
|--|-----|
| 3.3.1.6 Les fonctions de l'amine oxydase à cuivre chez les plantes... | 74 |
| 3.3.2 Les enzymes héminiques – la catalase | 75 |
| 3.3.2.1 Le stress oxydatif | 75 |
| 3.3.2.2 Le métabolisme du peroxyde d'hydrogène | 76 |
| 3.3.2.3 La structure et la fonction catalytique de la catalase | 78 |
| 3.3.2.4 La défense contre le stress oxydatif au niveau intestinal | 78 |
| 3.3.3 Les implications physiopathologiques de la diamine oxydase et de la catalase | 79 |
| 3.3.3.1 Le cancer intestinal et la diamine oxydase | 79 |
| 3.3.3.2 Les allergies alimentaires et la diamine oxydase | 80 |
| 3.3.3.3 Les maladies inflammatoires de l'intestin et la diamine oxydase | 80 |
| 3.3.3.4 Autres implications physiopathologiques de la diamine oxydase et de la catalase | 83 |
| CHAPITRE IV | |
| PRÉSENTATION DU PROJET | 85 |
| 4.1 Contributions à la recherche réalisées durant le doctorat | 93 |
| PARTIE II – PARTIE EXPÉRIMENTALE | 97 |
| CHAPITRE V | |
| UTILISATION DU CARBOXYMÉTHYL AMIDON RICHE EN AMYLOSE POUR LA FORMULATION ORALE GASTRO-RÉSISTANTE DES <i>FIMBRIAE</i> F4 | 98 |
| CHAPITRE VI | |
| MATRICE À BASE DE CARBOXYMÉTHYL AMIDON RICHE EN AMYLOSE: CHITOSANE POUR LA LIVRAISON DES PROBIOTIQUES AU NIVEAU DU CÔLON | 126 |
| CHAPITRE VII | |
| ZYMOGRAPHIE DE LA DIAMINE OXYDASE VÉGÉTALE EN UTILISANT UN GEL DE POLYACRYLAMIDE CONTENANT LA PEROXYDASE IMMOBILISÉE. UNE ÉTUDE DE STABILITÉ À LA PROTÉOLYSE | 154 |

| | |
|---|-----|
| CHAPITRE VIII | |
| MATRICES MONOLITHIQUES À BASE DE CARBOXYMÉTHYL AMIDON : CHITOSANE CONTENANT DIAMINE OXYDASE ET CATALASE POUR LIVRAISON INTESTINALE | 183 |
| CHAPITRE IX | |
| DISCUSSIONS ET CONCLUSION | 218 |
| ANNEXES | 240 |
| Carboxymethyl high amylose starch for F4 <i>fimbriae</i> gastro-resistant oral formulation | 241 |
| Carboxymethyl high amylose starch: Chitosan self-stabilized matrix for probiotic colon delivery | 249 |
| Zymographic assay of plant diamine oxidase on entrapped peroxidase polyacrylamide gel electrophoresis. A study of stability to proteolysis | 257 |
| Carboxymethyl high amylose starch as excipient affording resistance to gastric acidity for bioactive agents oral formulations | 267 |
| Carboxymethyl high amylose starch excipient for the F4 <i>fimbriae</i> gastro-resistant oral formulation | 269 |
| Gastro-resistant oral dosages based on carboxymethyl high amylose starch | 271 |
| Carboxymethyl high amylose starch – chitosan tablets affording colon probiotic delivery | 273 |
| Novel carboxymethyl starch excipients for oral dosage forms | 275 |
| Le carboxyméthyl amidon comme excipient pour la formulation et le transport des <i>fimbriae</i> F4 au niveau du tractus gastro-intestinal | 277 |
| Polymères biocompatibles comme excipients pour la formulation et le transport des bactéries lactiques au niveau du tractus gastro-intestinal | 278 |
| Carboxyméthyl amidon comme excipient pour le transport et la libération des bactéries d' <i>Escherichia coli</i> et des <i>fimbriae</i> F4 au niveau du tractus gastro-intestinal | 279 |
| Polymères biocompatibles pour le transport et la livraison des bactéries lactiques <i>Lactobacillus rhamnosus</i> au niveau du tractus gastro-intestinal | 281 |

| | |
|---|-----|
| Détermination de l'effet des adjuvants CpG et toxine choléra sur la réponse immunitaire contre les <i>fimbriae</i> F4 administrées oralement chez le porc | 282 |
| Polymères biocompatibles pour le transport et la livraison des bactéries lactiques <i>Lactobacillus rhamnosus</i> au niveau du tractus gastro-intestinal | 283 |
| Polymères biocompatibles pour le transport et la livraison des bactéries lactiques au niveau du tractus gastro-intestinal | 284 |
| Demande de brevet | 285 |
| BIBLIOGRAPHIE | 286 |

LISTE DES FIGURES

Partie Introduction

| | | |
|-------------|---|----|
| Figure 1.1: | Représentation schématique de l'amylose et de l'amylopectine... | 4 |
| Figure 1.2: | La structure ramifiée de l'amylopectine selon le modèle Meyer et Bernfield (<i>cité par</i> Thurn et Burchard, 1985)..... | 4 |
| Figure 1.3: | Les structures de l'amylose (<i>d'après</i> Manners, 1985)..... | 6 |
| Figure 1.4: | Représentation schématique du complexe formé par un acide gras emprisonné dans la cavité d'amylose (<i>d'après</i> Krog, 1971)..... | 7 |
| Figure 1.5: | Structures chimiques de la chitine et du chitosane..... | 10 |
| Figure 1.6: | Représentation schématique des interactions ioniques entre alginate et chitosane (<i>d'après</i> Kumar, 2000)..... | 15 |
| Figure 1.7: | Représentation schématique de la réaction de substitution de l'amidon par l'acide monochloracétique..... | 16 |
| Figure 1.8: | Représentation graphique du temps de libération d'un principe actif (théophylline) en fonction du degré de réticulation de l'amidon (<i>adaptation d'après</i> Dumoulin <i>et al.</i> , 1998)..... | 18 |
| Figure 1.9: | Représentation schématique de la stabilisation de l'amylose réticulé (<i>d'après</i> Dumoulin <i>et al.</i> , 1998)..... | 19 |
| Figure 2.1: | Variation de la concentration plasmatique d'un principe actif en fonction du système d'administration (<i>d'après</i> Hsieh, 1988)..... | 26 |
| Figure 2.2: | Représentation schématique des différents systèmes à libération contrôlée (<i>adaptation d'après</i> Langer, 1990)..... | 32 |
| Figure 2.3: | Représentation schématique des différents types de systèmes de relargage ciblé..... | 39 |

| | | |
|-------------|--|----|
| Figure 2.4: | Représentation schématique d'un système osmotique avec libération dépendante de la microflore du côlon (<i>d'après Liu et al., 2007</i>)..... | 40 |
| Figure 3.1: | La structure de LT-I et les mécanismes d'action des toxines sécrétées par les bactéries ETEC (<i>d'après Nataro et Kaper, 1998</i>)..... | 47 |
| Figure 3.2: | Images de microscopie électronique des bactéries lactiques..... | 57 |
| Figure 3.3: | Mécanismes possibles d'action des probiotiques sur la microflore ou via l'effet de résistance épithéliale ou du système immunitaire (<i>adaptation d'après Mahida et Rolfe, 2004</i>)..... | 61 |
| Figure 3.4: | La structure de l'amine oxydase (Cu-AO) provenant de l' <i>Escherichia coli</i> (ECAO) (<i>d'après Brazeau, Johnson et Wilmot, 2004</i>)..... | 66 |
| Figure 3.5: | Représentation schématique du mécanisme catalytique des amine oxydases à cuivre (Cu-AO) (<i>adapté d'après Brazeau, Johnson et Wilmot, 2004</i>)..... | 68 |
| Figure 3.6: | Le métabolisme de l'histamine (<i>adaptation d'après Maintz et Novak, 2007</i>)..... | 73 |
| Figure 3.7: | Les réactions métaboliques du peroxyde d'hydrogène (<i>adaptation d'après Agostinelli et Seiler, 2006</i>)..... | 77 |
| Figure 4.1: | Présentation schématique des différentes étapes du projet doctoral..... | 90 |

Partie Expérimentale

| | | |
|-------------|---|-----|
| Figure 5.1: | ¹ H NMR spectrum of CM-HAS after hydrolytic chain degradation..... | 119 |
| Figure 5.2: | Stability of F4 <i>fimbriae</i> in simulated gastric fluid (SGF/USP).... | 120 |
| Figure 5.3: | Delivery of F4 <i>fimbriae</i> in pancreatin-free simulated intestinal fluid (SIF/USP)..... | 121 |

| | | |
|-------------|--|-----|
| Figure 5.4: | Delivery of F4 <i>fimbriae</i> in simulated intestinal fluid containing pancreatin (SIF/USP)..... | 122 |
| Figure 5.5: | Water uptake and erosion of CM-HAS tablet matrices..... | 124 |
| Figure 5.6: | Stability of F4 <i>fimbriae</i> in simulated intestinal fluid (SIF/USP)..... | 125 |
| Figure 6.1: | Liberation of living <i>Lactobacillus rhamnosus</i> formulated in CM-HAS:Chitosan (MW1-4) monolithic tablets following incubation in gastric and intestinal medium..... | 148 |
| Figure 6.2: | Water uptake of monolithic matrices based on CM-HAS:Chitosan (MW1-4)..... | 149 |
| Figure 6.3: | Erosion studies of CM-HAS:Chitosan (MW1-4) monolithic tablets..... | 150 |
| Figure 6.4: | Liberation of living <i>Lactobacillus rhamnosus</i> formulated in CM-HAS dry coated tablets containing CM-HAS:Chitosan (MW1-4) core following incubation in gastric and intestinal medium..... | 152 |
| Figure 6.5: | Scanning electron microscopy images from surface structures of CM-HAS:Chitosan matrices..... | 153 |
| Figure 7.1: | Electrophoretic pattern of vegetal extract from <i>L. sativus</i> seedlings..... | 177 |
| Figure 7.2: | The influence of sodium dodecyl sulfate on the enzymatic activity of DAO..... | 178 |
| Figure 7.3: | Electrophoretic pattern of diamine oxidase from the vegetal extract of <i>L. sativus</i> seedlings in simulated gastric fluid (SGF, pH 1.2)..... | 180 |
| Figure 7.4: | Stability of diamine oxidase from <i>L. sativus</i> vegetal extract in simulated intestinal fluid (SIF, pH 6.8)..... | 181 |
| Figure 7.5: | Densitometric analysis of diamine oxidase from <i>L. sativus</i> vegetal extract after incubation in simulated intestinal fluid (SIF, pH 6.8), with or without pancreatin..... | 182 |

| | | |
|-------------|--|-----|
| Figure 8.1: | pH stability of enzyme formulations based on CMS:Chitosan.... | 210 |
| Figure 8.2: | Gastric stability and intestinal delivery of vegetal DAO (PSDAO) in different formulations..... | 212 |
| Figure 8.3: | Gastric stability and intestinal release of catalase at different loadings formulated with CMS:Chitosan..... | 213 |
| Figure 8.4: | Mono- and bi-enzymatic CMS:Chitosan formulations containing vegetal PSDAO and/or catalase..... | 214 |
| Figure 8.5: | Evaluation of DAO enzymatic activity in the presence of catalase..... | 215 |
| Figure 8.6: | <i>In vitro</i> evaluation of the bi-enzymatic formulation based on CMS:Chitosan..... | 216 |
| Scheme 8.1: | Representation of the enzymatic coupled reactions of DAO..... | 217 |

Discussion et conclusions

| | | |
|-------------|--|-----|
| Schema 9.1: | Représentation schématique du principe de la méthode zymographique modifiée..... | 229 |
|-------------|--|-----|

Annexe

Carboxymethyl high amylose starch for F4 *fimbriae* gastro-resistant oral formulation

| | | |
|-----------|---|-----|
| Figure 1: | ¹ H NMR spectrum of CM-HAS after hydrolytic chain degradation..... | 245 |
| Figure 2: | Stability of F4 <i>fimbriae</i> in simulated gastric fluid (SGF/USP).... | 246 |
| Figure 3: | Delivery of F4 <i>fimbriae</i> in pancreatin-free simulated intestinal fluid (SIF/USP)..... | 246 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| Figure 4: | Delivery of F4 <i>fimbriae</i> in simulated intestinal fluid containing pancreatin (SIF/USP)..... | 246 |
| Figure 5: | Water uptake and erosion of CM-HAS tablet matrices..... | 247 |
| Figure 6: | Stability of F4 <i>fimbriae</i> in simulated intestinal fluid (SIF/USP)... | 247 |

Carboxymethyl high amylose starch: Chitosan self-stabilized matrix for probiotic colon delivery

| | | |
|-----------|--|-----|
| Figure 1: | Liberation of living <i>Lactobacillus rhamnosus</i> formulated in CM-HAS:Chitosan (MW1-4) monolithic tablets following incubation in gastric and intestinal medium..... | 251 |
| Figure 2: | Water uptake of monolithic matrices based on CM-HAS:Chitosan (MW1-4)..... | 252 |
| Figure 3: | Erosion studies of CM-HAS:Chitosan (MW1-4) monolithic tablets..... | 253 |
| Figure 4: | Liberation of living <i>Lactobacillus rhamnosus</i> formulated in CM-HAS dry-coated tablets containing CM-HAS:Chitosan (MW1-4) core following incubation in gastric and intestinal medium..... | 254 |
| Figure 5: | Scanning electron microscopy images from surface structures of CM-HAS:Chitosan matrices..... | 255 |

Zymographic assay of plant diamine oxidase on entrapped peroxidase polyacrylamide gel electrophoresis. A study of stability to proteolysis

| | | |
|-----------|--|-----|
| Figure 1: | Electrophoretic pattern of vegetal extract from <i>L. sativus</i> seedlings..... | 261 |
| Figure 2: | The influence of sodium dodecyl sulfate on the enzymatic activity of DAO..... | 262 |
| Figure 3: | Electrophoretic pattern of diamine oxidase from the vegetal extract of <i>L. sativus</i> seedlings in simulated gastric fluid (SGF, pH 1.2)..... | 263 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| Figure 4: | Stability of diamine oxidase from <i>L. sativus</i> vegetal extract in simulated intestinal fluid (SIF, pH 6.8)..... | 264 |
| Figure 5: | Densitometric analysis of diamine oxidase from <i>L. sativus</i> vegetal extract after incubation in simulated intestinal fluid (SIF, pH 6.8), with or without pancreatin..... | 265 |

Carboxymethyl high amylose starch as excipient affording resistance to gastric acidity for bioactive agents oral formulations

| | | |
|-----------|--|-----|
| Figure 1: | Stability of <i>L. rhamnosus</i> bacteria and α -amylase formulated with CM-HAS in simulated gastric fluid..... | 268 |
| Figure 2: | Liberation of α -amylase formulated with CM-HAS in PBS solution (pH 7.2)..... | 268 |

Carboxymethyl high amylose starch excipient for the F4 *fimbriae* gastro-resistant oral formulation

| | | |
|-----------|--|-----|
| Figure 1: | Stability of F4 <i>fimbriae</i> in simulated gastric medium (SGF/USP)..... | 270 |
| Figure 2: | Liberation of F4 <i>fimbriae</i> in simulated intestinal medium (SIF/USP)..... | 270 |

Gastro-resistant oral dosages based on carboxymethyl high amylose starch

| | | |
|-----------|--|-----|
| Figure 1: | Dissolution profiles for acetaminophen tablets based on CM-HAS..... | 272 |
| Figure 2: | Release of live <i>Lactobacillus rhamnosus</i> bacteria formulated with CM-HAS in SGF and SIF compared with free bacteria..... | 272 |

Carboxymethyl high amylose starch – chitosan tablets affording colon probiotic delivery

| | | |
|-----------|---|-----|
| Figure 1: | Liberation of living <i>Lactobacillus rhamnosus</i> formulated in tablets with CM-HAS and chitosan (640 cps) following incubation in gastric and intestinal medium..... | 274 |
|-----------|---|-----|

Novel carboxymethyl starch excipients for oral dosage forms

| | | |
|-----------|---|-----|
| Figure 1: | Dissolution profiles for diclofenac monolithic tablets based on CM(H)S and CM(Na)S..... | 276 |
| Figure 2: | Dissolution profiles for diclofenac dry-coated tablets based on CM(H)S and CM(Na)S..... | 276 |
| Figure 3: | Acetyl salicylic acid release from dry-coated tablets based on CM(H)S and CM(Na)S..... | 276 |

LISTE DES TABLEAUX

Partie Introduction

| | | |
|--------------|---|----|
| Tableau 3.1: | Les paramètres cinétiques (k_{cat} , K_m) et l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) des amines oxydases provenant du <i>Lathyrus cicera</i> (LCAO), <i>Pisum sativum</i> (PSAO) et sérum bovin (BSAO), à 25 °C..... | 71 |
|--------------|---|----|

Partie Expérimentale

| | | |
|--------------|---|-----|
| Tableau 5.1: | Determination of the degree of substitution of non-cross-linked CM-HAS excipient..... | 118 |
| Tableau 6.1: | Modulation of bacteria liberation from CM-HAS:Chitosan formulations by different molecular weights of Chitosan..... | 146 |

Annexe

Carboxymethyl high amylose starch for F4 *fimbriae* gastro-resistant oral formulation

| | | |
|------------|---|-----|
| Tableau 1: | Determination of the degree of substitution of non-cross-linked CM-HAS excipient..... | 244 |
|------------|---|-----|

Carboxymethyl high amylose starch: Chitosan self-stabilized matrix for probiotic colon delivery

| | | |
|------------|---|-----|
| Tableau 1: | Modulation of bacteria liberation from CM-HAS:Chitosan formulations by different molecular weights of Chitosan..... | 252 |
|------------|---|-----|

Carboxymethyl high amylose starch – chitosan tablets affording colon probiotic delivery

| | | |
|------------|---|-----|
| Tableau 1: | Modulation of bacteria liberation by different molecular weights of chitosan..... | 274 |
|------------|---|-----|

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|----------------------|--|
| AAO | Aminoacide oxydase |
| AGAO | Amine oxydase provenant d' <i>Arthrobacter globiformis</i> |
| AMPc | Adénosine monophosphate cyclique |
| AO | Amine oxydase |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| BSAO | Amine oxydase provenant du sérum bovin |
| <i>B. sp.</i> | Espèces de <i>Bifidobacterium</i> |
| CFU | Unités formatrices de colonies |
| CM | Carboxyméthyle |
| CMA | Carboxyméthyl amidon |
| CM-HAS | Carboxyméthyl amidon riche en amylose |
| CMS | Carboxyméthyl amidon |
| Cu-AO | Amine oxydase à cuivre |
| DAO | Diamine oxydase |
| DDA | Degré de déacétylation |
| DS | Degré de substitution |
| ECAO | Amine oxydase provenant d' <i>Escherichia coli</i> |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EHEC | <i>Escherichia coli</i> entérohémorragique |
| EIEC | <i>Escherichia coli</i> entéroinvasive |
| EPEC | <i>Escherichia coli</i> entéropathogène |
| ERO | Espèces réactives d'oxygène |
| ETEC | <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène |
| ETEC F4 ⁺ | <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène qui présente des <i>fimbriae</i> F4 |

| | |
|-----------------------|---|
| ETEC F5 ⁺ | <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène qui présente les <i>fimbriae</i> F5 |
| ETEC F18 ⁺ | <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène qui présente les <i>fimbriae</i> F18 |
| EU | Unité enzymatique |
| FAD-AO | Amine oxydase avec flavine adénine dinucléotide |
| F4R ⁺ | Récepteur F4 positif |
| FTIR | Spectroscopie infrarouge à transformée Fourier |
| GABA | Acide gamma-aminobutyrique |
| GDH | <i>L</i> -glutamate déshydrogénase |
| GMPc | Guanosine monophosphate cyclique |
| GSH | Glutathion (forme réduite) |
| GSSG | Glutathion (forme oxydée) |
| GTP | Guanosine triphosphate |
| HAS | Amidon riche en amylose |
| HNMT | <i>N</i> -méthyltransférase |
| HPAO | Amine oxydase provenant d' <i>Hansenula polymorpha</i> |
| IBD | Maladies inflammatoires de l'intestin |
| IFN-gamma | Interféron-gamma |
| Ig | Immunoglobuline |
| IL | Interleukine |
| IOD | Densité optique intégrée |
| KGA | Acide alpha-cétoglutarique |
| LCAO | Amine oxydase provenant du <i>Lathyrus cicera</i> |
| <i>L. sativus</i> | <i>Lathyrus sativus</i> |
| <i>L. sp.</i> | Espèces de <i>Lactobacillus</i> |
| LT | Toxine thermo-labile |
| MAO | Monoamine oxydase |
| MM | Masse moléculaire |
| MRS | Milieu DeMan, Rogosa et Sharpe |
| M _t | Quantité de médicament libéré au temps t |

| | |
|-------------------|---|
| M_{∞} | Quantité totale de médicament libéré |
| MW | Poids moléculaire |
| MW_v | Masse moléculaire moyenne viscosimétrique |
| MyPO | Myéloperoxydase |
| NAD | Nicotinamide adénine dinucléotide |
| NADPH | Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite) |
| NMR | Résonance magnétique nucléaire |
| $O_2^{\cdot -}$ | Superoxyde |
| 1O_2 | Oxygène singulet |
| HO^{\cdot} | Radical hydroxyle |
| OPDA | <i>ortho</i> -phénylène diamine |
| PAA | Gel de polyacrylamide |
| PAO | Polyamine oxydase |
| PBS | Solution de tampon phosphate |
| PPAO | Amine oxydase provenant du <i>Pichia pastoris</i> |
| PSAO | Amine oxydase provenant du <i>Pisum sativum</i> |
| <i>P. sativum</i> | <i>Pisum sativum</i> |
| PSDAO | Diamine oxydase provenant du <i>Lathyrus sativus</i> (" <i>grass pea seedlings diamine oxidase</i> ") |
| SEM | Microscopie électronique à balayage |
| SDS-PAGE | Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium |
| SGF | Fluide gastrique simulé |
| SIF | Fluide intestinal simulé |
| SKDAO | Diamine oxydase provenant des reins de porc |
| SOD | Superoxyde dismutase |
| ST | Toxine thermo-stable |
| t | Temps |
| TBS | Solution de tampon Tris |

| | |
|------------|---------------------------------------|
| TNF- alpha | Facteur de nécrose tumorale-alpha |
| TPQ | 2,4,5-trihydroxyphenylalanine quinone |
| TTBS | Solution de TBS contenant Tween-20 |
| USP | La Pharmacopée des États-Unis |
| VAP-1 | Protéine d'adhésion vasculaire-1 |
| VTEC | <i>Escherichia coli</i> vérotoxigène |

INTRODUCTION SOMMAIRE DE L'ENSEMBLE DE LA THÈSE

Le projet de recherche présenté dans cette thèse fait partie de l'ensemble des projets du Laboratoire d'Enzymologie et des Polymères Biocompatibles (Université du Québec à Montréal). Les travaux ont à la base la formulation de plusieurs agents bioactifs dans le cadre du développement de nouvelles formulations pharmaceutiques qui peuvent assurer une bonne protection gastrique des agents bioactifs et leur livraison à un site spécifique (*i.e.* au niveau de l'intestin grêle ou au côlon). Ainsi, ce projet doctoral a permis d'avoir une vue d'ensemble sur la formulation de plusieurs agents bioactifs. Le développement des systèmes à libération des agents actifs connaît, à date, un développement spectaculaire. Dans ce contexte, cette thèse propose l'utilisation des matrices monolithiques / double-noyau représentées par des nouvelles variantes polymériques à base d'amidon non-réticulé mais modifié par carboxyméthylation, utilisé seul ou en association avec un autre polymère d'origine naturelle, le Chitosane. La thèse est présentée en deux parties: partie I – *Introduction* et partie II – *Partie expérimentale*.

La partie introductive présente des aspects théoriques sur les deux principaux excipients polymériques utilisés, l'amidon et le chitosane (*i.e.* structure et propriétés) et leurs dérivés, des systèmes de transport et de livraison des médicaments et des agents bioactifs administrables par voie orale. Sont également présentés les principaux groupes d'agents actifs utilisés dans ce projet : *les vaccins* (vaccins sous-unitaire à base

des *fimbriae* F4 et vaccins bactériens à base d'*Escherichia coli* F4⁺), les probiotiques (avec une brève définition des effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine et leur utilisation pour contrôler les maladies inflammatoires de l'intestin) et, finalement, les *métallo-enzymes avec potentiel thérapeutique* (les amines oxydases et les enzymes héminiques).

La *Partie expérimentale*, présente des contributions originales, chaque contribution étant illustrée sous forme d'article: la formulation d'un vaccin sous-unitaire à base des *fimbriae* F4, la formulation du probiotique *Lactobacillus rhamnosus*, une étude de stabilité de la diamine oxydase à la protéolyse et une étude de formulation d'enzymes thérapeutiques: la diamine oxydase et/ou la catalase.

La partie pratique est suivie par une section "Discussions et conclusion" qui présente une synthèse de l'ensemble des résultats expérimentaux obtenus, le tout étant discuté dans le contexte de la littérature scientifique publiée à date. À la fin de la thèse, sous la section "Annexes", plusieurs contributions scientifiques (articles publiés, transactions et actes des conférences internationales, présentation aux congrès, demande de brevet) sont présentées. La section "Bibliographie" présente une liste avec plus de 300 références de littérature scientifique qui viennent d'appuyer les informations présentées dans cette thèse.

Résumé

Ce projet a été dédié à la recherche et au développement de formulations pharmaceutiques pour la livraison d'agents bioactifs au niveau de l'intestin grêle/côlon. Les protéines/enzymes et les probiotiques sont très sensibles aux conditions drastiques du tractus digestif (acidité gastrique, présence des enzymes digestives) et ils perdent facilement leurs activités biologiques spécifiques. Pour maintenir ces activités, des formulations doivent être envisagées pour l'administration des agents bioactifs par voie orale. L'utilisation des dérivés macromoléculaires d'origine naturelle comme systèmes de transport et de livraison des actifs s'avère intéressante pour l'industrie pharmaceutique. Dans ce contexte, l'amidon modifié, non-réticulé (carboxyméthyl amidon, CMA) et/ou l'association CMA:Chitosane ont été proposés comme matrices (sous forme de comprimés) pour le transport et la livraison d'un vaccin sous-unitaire à base de *fimbriae* F4, d'un probiotique *Lactobacillus rhamnosus* et de deux enzymes thérapeutiques, la diamine oxydase (DAO) et la catalase, au niveau de l'intestin grêle et/ou côlon. Le maintien de l'activité spécifique de liaison des *fimbriae* F4 aux récepteurs est une caractéristique essentielle pour l'induction d'une réponse immunitaire muco-sale au niveau de l'intestin grêle chez le porcelet. La formulation des *fimbriae* F4 avec le CMA a eu un effet bénéfique sur leur stabilité dans le milieu gastrique, en étant libérées sur une période de jusqu'à 5 h dans le milieu intestinal simulé. Un nouveau système (comprimé) basé sur une stabilisation physique et chimique entre le CMA (excipient carboxylé) et le chitosane (excipient avec des groupes amines) a été aussi proposé pour la livraison retardée du probiotique *L. rhamnosus* et de deux enzymes thérapeutiques, la DAO et la catalase, au niveau du côlon. L'association CMA:Chitosane a amélioré sensiblement les propriétés du CMA comme transporteur d'agents bioactifs, en retardant leur livraison dans le milieu intestinal simulé. Ainsi, l'augmentation du pourcentage et de la masse moléculaire du chitosane a diminué la quantité des bactéries libérées due à la formation d'un gel à la surface des comprimés. Le comportement complémentaire de ces deux polymères (CMA, compact en milieu acide et soluble dans un milieu neutre/alcalin et chitosane, soluble au pH acide et insoluble au pH alcalin/intestinal) semble moduler et améliorer réciproquement la libération des principes actifs. La matrice CMS:Chitosane a aussi assuré une bonne protection gastrique de la DAO contenue dans l'extrait végétal de germes de *Lathyrus sativus* ("pea seedlings DAO", PSDAO), et de la catalase. Des activités enzymatiques variables de la DAO ont été trouvées dans les conditions intestinales, en fonction du temps de résidence des comprimés CMA:Chitosane dans le milieu gastrique simulé. Concernant la catalase, pour les formulations contenant des charges élevées en enzyme, des possibles associations protéine-protéine ont eu un effet marqué sur sa libération, en diminuant la libération d'enzyme. Des formulations bi-enzymatiques DAO:Catalase à base de CMA:Chitosane ont été aussi étudiées. Ainsi, les deux enzymes ont été libérées presque en même temps, et le peroxyde d'hydrogène (le produit de l'activité de la DAO) a été décomposé par la catalase. La thèse présente aussi une nouvelle méthode zymographique pour la DAO, basée sur une réaction couplée à la peroxydase immobilisée dans un gel de polyacrylamide. La stabilité de la DAO à la protéolyse a été étudiée dans les conditions qui simulent les milieux gastrique et intestinal. Après 10 h d'incubation de la PSDAO dans un milieu intestinal simulé (37 °C), une certaine stabilité de la DAO a été observée en présence de la pancréatine. Ces nouvelles formulations bio-pharmaceutiques pourraient constituer des alternatives intéressantes pour la prévention de la diarrhée post-sevrage chez le porcelet (vaccin à base des *fimbriae* F4) et pour la prévention ou la thérapie de différentes maladies entériques (probiotiques, DAO:Catalase).

Mots clés: carboxyméthyl amidon, chitosane, *fimbriae*, probiotique, diamine oxydase, catalase, comprimés, administration orale.

PARTIE I

INTRODUCTION

CHAPITRE I

L'AMIDON, LE CHITOSANE ET LEURS DÉRIVÉS COMME EXCIPIENTS PHARMACEUTIQUES

1.1 L'amidon – structure et propriétés

1.1.1 La structure de l'amidon, de l'amylose et de l'amylopectine

L'amidon est un polysaccharide naturel provenant de la photosynthèse et permettant le stockage du glucose chez les plantes. Les graines de céréales (blé, maïs) et certains tubercules (pommes de terre) représentent la principale source d'amidon et l'aspect du grain et sa forme dépendent de l'espèce végétale à laquelle il appartient. La synthèse de l'amidon à partir du glucose a lieu dans des amyloplast, des compartiments subcellulaires contenant toutes les enzymes nécessaires. Les granules d'amidon contiennent deux polysaccharides: l'amylose et l'amylopectine (Néel, 1965), l'amylose étant synthétisé en quantité moins grande au début du processus de développement d'un granule d'amidon et augmentant avec la maturation des granules. Les granules d'amidon ont une structure semi-cristalline (French, 1984), et l'amylose, présente sous forme de doubles hélices, constitue les portions cristallines (ordonnées) du granule. À l'intérieur des granules d'amidon, les chaînes d'amylopectine ont un arrangement radial, elles irradiant à partir du centre du granule d'amidon jusqu'à sa surface. Jane et ses collaborateurs (1993) ont montré que, dans les granules de maïs et de pommes de terre, les chaînes d'amylose se positionnent entre les chaînes d'amylopectine, les macromolécules d'amylose étant enchevâchées avec les

macromolécules d'amylopectine, et, qu'à la périphérie et au centre du granule d'amidon, les chaînes ramifiées d'amylopectine ont des différentes longueurs. De plus, les molécules d'amylose sont plus concentrées et ont une taille moléculaire moins grande à la périphérie que celles situées au centre du granule d'amidon, ce qui suggère que les molécules d'amylose synthétisées dans les étapes tardives ne peuvent pas se développer totalement.

En fonction de son origine, l'amidon contient des différentes proportions d'amylose, et le pourcentage d'amylose peut être augmenté par génie génétique. La majorité des amidons contiennent 20-30% d'amylose et 70-80% d'amylopectine (Langlois et Wagoner, 1967). Grâce aux méthodes génétiques, il est possible d'obtenir des amidons riches en amylose qui peuvent contenir entre 50% et 80% d'amylose. Ainsi, l'amidon de type Hylon[®] V contient 57% amylose et l'amidon de type Hylon[®] VII, 71% amylose. Les différents pourcentages d'amylose et d'amylopectine peuvent conduire à des changements appréciables dans les propriétés physiques et dans la fonctionnalité de l'amidon. Les masses moléculaires de l'amylose et de l'amylopectine varient en fonction de leur origine et de la procédure de préparation. Ainsi, les masses moléculaires de l'amylose et respectivement, de l'amylopectine sont comprises entre $1,6 - 26,5 \times 10^5$ Da pour amylose et entre $0,7 - 4 \times 10^8$ Da pour amylopectine (Lelievre, Lewis et Marsden, 1986).

L'amylose est un polysaccharide non-ramifié, formé d'unités de D-glucopyranose liées les unes aux autres par des liaisons 1,4- α -glucosidiques (Figure 1.1a). Dans cette structure, le carbone C-1 de chaque unité de glucose adopte une configuration stérique α . Dans l'amidon, l'amylose s'associe à l'amylopectine, un polysaccharide ramifié (Figure 1.1b) qui présente des liaisons 1,4- α - et 1,6- α -glucosidiques. L'amylopectine présente des ramifications à peu près à chacun 20 - 30 résidus de glucose (Figure 1.2).

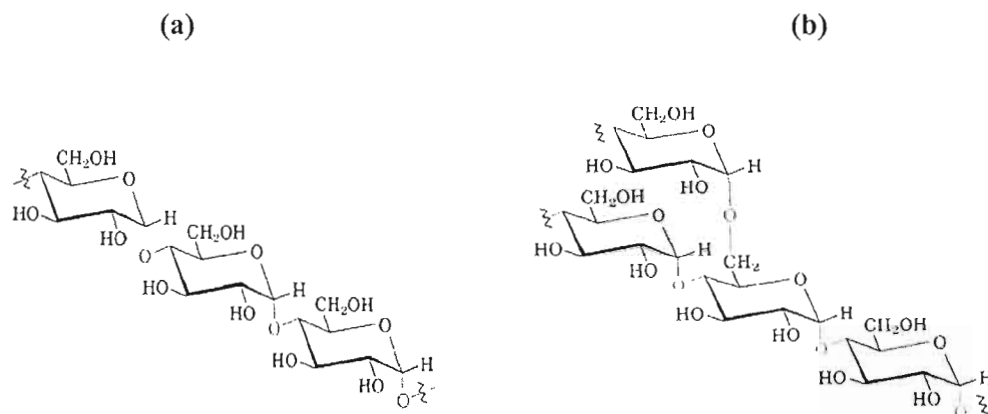


Figure 1.1: Représentation schématique de l'amylose et de l'amylopectine
(a) Amylose: unités de D-glucopyranose liées par des liaisons 1,4- α -glucosidiques, **(b)** Amylopectine: unités de D-glucopyranose liées par des liaisons 1,4- α -glucosidiques formant des chaînes avec des points de ramification de type 1,6- α -glucosidique.

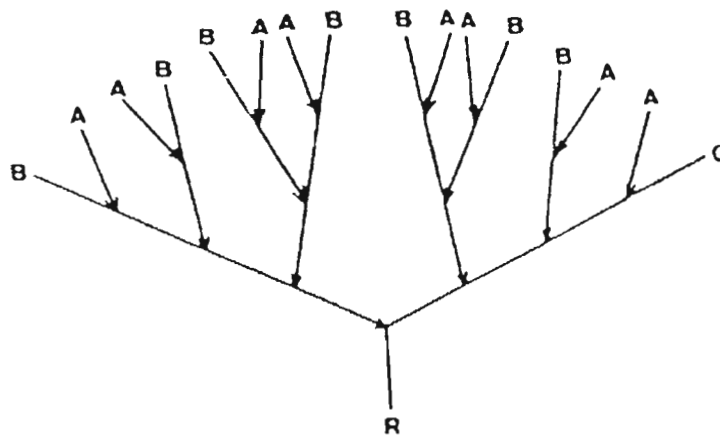


Figure 1.2: La structure ramifiée de l'amylopectine selon le modèle Meyer et Bernfield (1940). C est la seule chaîne B de la molécule qui présente le groupement réducteur R. A est toujours une chaîne non-ramifiée située vers l'extérieur de la molécule. La chaîne B est toujours ramifiée (citée par Thurn et Burchard, 1985).

En fonction de l'origine de l'amidon et de son traitement technologique, les diagrammes de diffraction de rayons X peuvent être différents. Ainsi, l'amidon se trouve sous plusieurs formes: les polymorphes de type A, B, C et V. En général, l'amidon de type A est caractéristique des amidons de céréales, celui de type B est caractéristique pour les amidons de tubercules et le type C correspond à un mélange des polymorphes de type A et B. La forme V de l'amidon est généralement observée dans les régions amorphes (non cristallines) de l'amidon (Veregin, Fyfe et Marchessault, 1987).

Les structures cristallines de type A et B de l'amylose (Figure 1.3) sont représentées par de doubles hélices empaquées d'une façon antiparallèle dans une unité cellulaire orthorhombique (type A) ou dans une unité cellulaire hexagonale avec deux hélices (12 résidus de D-glucose) par cellule (type B) (Wu et Sarko, 1978a; 1978b). Suite à l'empaquetage des chaînes d'une façon antiparallèle, un canal central est créé et celui-ci est rempli par les molécules d'eau. Ainsi, un nombre de quatre molécules d'eau est inséré entre les doubles hélices de la forme A, tandis que la cavité remplie d'eau au centre de la forme B peut contenir jusqu'à 36 molécules d'eau (Wu et Sarko, 1978a). Les études par diffraction de rayons X ont permis d'établir que l'amylose V adopte une configuration hélicoïdale (hélice simple) avec 6 unités de glucose par tour d'hélice. L'amylose sous forme V anhydre (simple hélice) peut évoluer vers la forme V hydratée en présence d'un milieu aqueux, en se transformant progressivement en amylose B (double hélice). Ce processus comporte deux étapes: i) l'introduction de molécules d'eau dans les interstices séparant les différentes hélices (ce qui correspond à la fixation d'une molécule d'eau par motif de glucose) et ii) la pénétration de l'eau à l'intérieur des canaux cylindriques axiaux, suivi par une modification structurale importante qui conduit à la forme B (Néel, 1972).

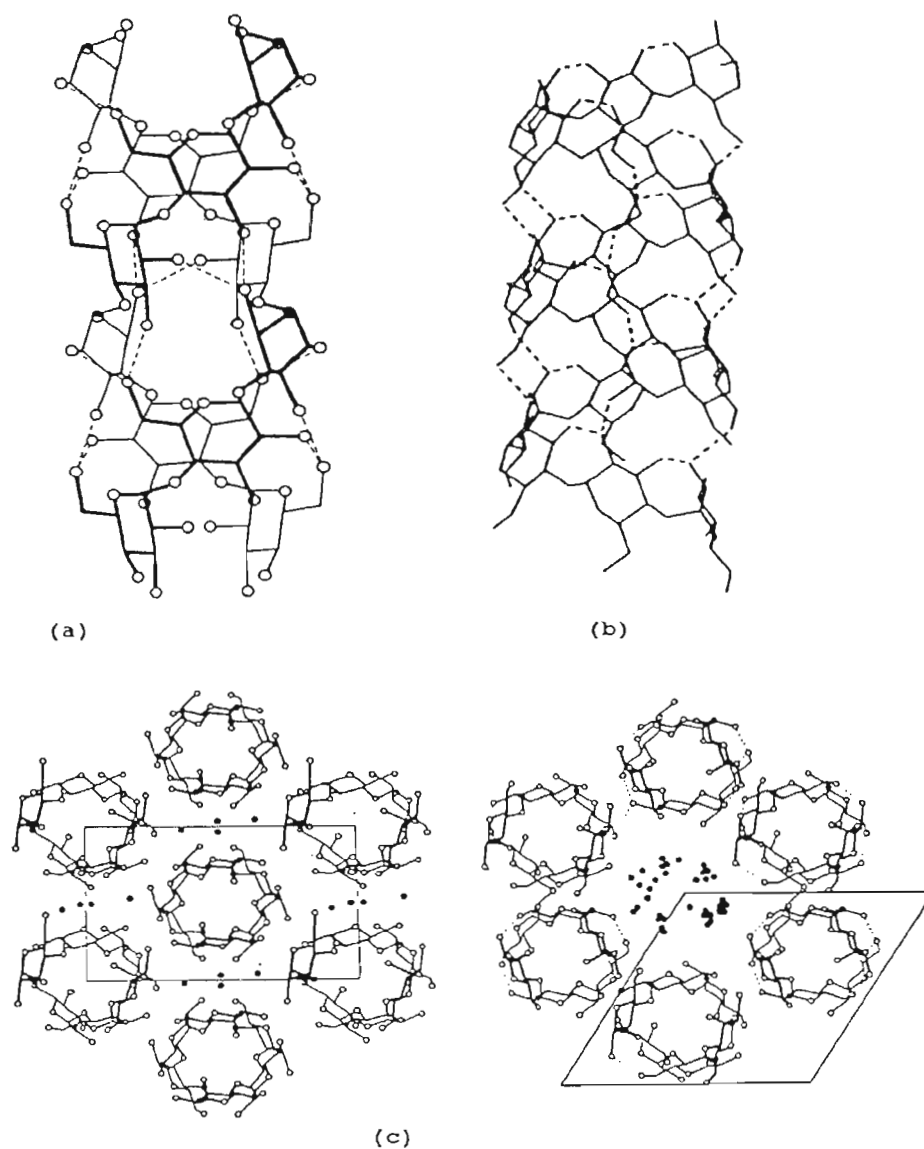


Figure 1.3: Les structures de l'amylose

(a) amylose A et amylose B, (b) amylose V, (c) empaquetage cristallin de l'amylose A (gauche) et de l'amylose B (droite). Les ponts d'hydrogène sont indiqués en pointillé et les molécules d'eau par les cercles "●" (d'après Manners, 1985).

L'amylose V, en contraste avec les autres deux types A et B, a une cavité centrale relativement large dans son hélice, ce qui permet aux différentes molécules d'entrer. Ainsi, l'amidon peut former des complexes avec plusieurs molécules et les structures sont stabilisées par les liaisons d'hydrogène. En présence d'iode, l'amylose forme un complexe bleu, caractéristique bien connue des composés d'inclusion d'iode (Foster, 1965). Dans le complexe, les molécules d'iode sont alignées sur les axes des hélices (une molécule d'halogène par tour d'hélice). La formation du complexe ne peut pas avoir lieu à des températures élevées et dans un milieu aqueux d'hydroxyde de potassium (Foster, 1965). L'amylose se complexe aussi bien à des acides gras dont la longueur de chaîne se situe entre 14 et 18 carbones (Krog, 1971) par emprisonnement de ceux-ci à l'intérieur de la cavité formée (Figure 1.4). Les phénols, le cyclohexane, les dérivés benzoïques ayant un groupement aldéhyde, les composés aliphatiques cétoniques forment aussi des complexes avec l'amylose. Dans tous ces cas, les diagrammes de diffraction de rayons-X de ces complexes ont mis en évidence une structure hélicoïdale de type simple hélice (structure V) de l'amylose.

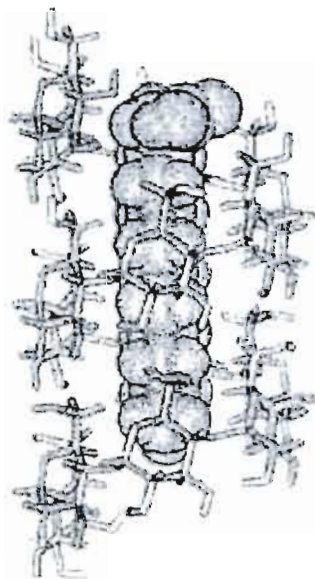


Figure 1.4: Représentation schématique du complexe formé par un acide gras emprisonné dans la cavité d'amylose (d'après Krog, 1971).

1.1.2 Les caractéristiques physiques de l'amidon

1.1.2.1 La solubilité

Les granules d'amidon sont insolubles dans l'eau à la température ambiante, mais vont gonfler à son contact. Ainsi, les molécules d'eau pénètrent rapidement dans les régions amorphes du granule, ce qui va avoir comme résultat la formation des ponts d'hydrogène avec les chaînes d'amylose et d'amylopectine. En chauffant la suspension d'amidon ou en l'ajoutant dans un milieu alcalin, il est possible de dissoudre les granules d'amidon. Ce processus se fait en deux étapes: la solubilisation de l'amylose qui sort du granule et la destruction du grain avec la libération de l'amylopectine (Young, 1984).

1.1.2.2 La gélatinisation

La gélatinisation est le processus dans lequel, à la suite d'un chauffage d'une suspension d'amidon, il y a une perte partielle ou totale de sa structure cristalline et de son insolubilité. Le granule d'amidon chauffé dans une solution aqueuse va gonfler suite à l'entrée de l'eau, et puis, à partir d'une certaine température, les ponts d'hydrogène vont être détruits et les molécules d'amylose avec une taille moléculaire petite vont sortir et vont être solubilisées en premier. La température de gélatinisation varie en fonction de l'origine de chaque amidon (pourcentage d'amylose) et de la présence de certains agents chimiques, comme le sulfate de sodium, qui est ajouté pour réprimer la gélatinisation des granules d'amidon, ou le nitrate de sodium, ajouté pour diminuer la température de gélatinisation (Leach, 1965). En général, la température de gélatinisation se situe entre 60–70 °C. Dans le cas de l'amidon riche en amylose, la gélatinisation ne nécessite pas des températures plus élevées que 50 °C.

1.1.2.3 La gélification

La gélification consiste en la formation d'un gel lors du refroidissement d'une solution d'amidon qui a été préalablement gélatinisée. Le phénomène de gélification pourrait être attribué à l'association des chaînes d'amylose (par des liaisons d'hydrogène) dans un réseau tridimensionnel. Cette association moléculaire, détruite par chauffage, se reforme par refroidissement (Young, 1984). Les gels d'amylose sont représentés par des régions amorphes (simple hélice) et des régions cristallines (double hélice) (Gidley, 1989), les zones cristallines étant liées entre elles par des chaînes en simple hélice à caractère amorphe.

1.1.2.4 La rétrogradation

L'état de gélification est transitoire, puisque l'organisation des chaînes d'amylose va se poursuivre donnant un gel de plus en plus rigide. Ce phénomène s'appelle rétrogradation et se traduit par une diminution de la viscosité, une augmentation de la turbidité et de la résistance aux attaques enzymatiques (Néel, 1965). En effet, la rétrogradation est le processus suivant la gélification par lequel les dispersions d'amylose se transforment de la forme soluble à la forme insoluble. Nouvelles interactions entre les macromolécules peuvent se former, ce qui a comme résultat l'obtention des agrégats insolubles. Ainsi, la rétrogradation entraîne un resserrement de la texture du gel qui provoque une synérèse, avec l'expulsion de l'eau incluse entre les chaînes de macromolécules (Néel, 1965). La synérèse se trouve à l'origine des difficultés technologiques concernant l'utilisation des produits à base d'amylose.

1.2 Le chitosane – origine, structure et propriétés

1.2.1 L'origine et la structure du chitosane

Le chitosane est un polysaccharide non-ramifié de type poly 1,4-(β -D-glucosamine), partiellement acétylé, qui est obtenu à partir de la chitine, une poly 1,4-(β -N-acétyl-D-glucosamine), par une réaction de déacétylation (Figure 1.5 a,b). La chitine est présente dans l'exosquelette des arthropodes, des insectes, des crustacés et dans la paroi cellulaire de nombreux champignons, étant le biopolymère le plus abondant après la cellulose. Tandis que la chitine est produite par un grand nombre d'organismes vivants, le chitosane est assez rare dans la nature, avec l'exception de certains champignons. Durant la procédure de préparation du chitosane, les carapaces sont traitées avec acides et bases (pour enlever les minéraux et les protéines), et la chitine extraite est deacétylée par une hydrolyse dans un milieu alcalin, à haute température. La préparation du chitosane à partir des carapaces de crustacés est désirable du point de vue écologique, car des grandes quantités de déchets, provenant de la consommation de crustacés, sont générées dans l'industrie alimentaire. Durant les dernières années, il y a eu un certain intérêt de produire le chitosane par des méthodes de fermentation, en utilisant des champignons (Nwe *et al.*, 2002).

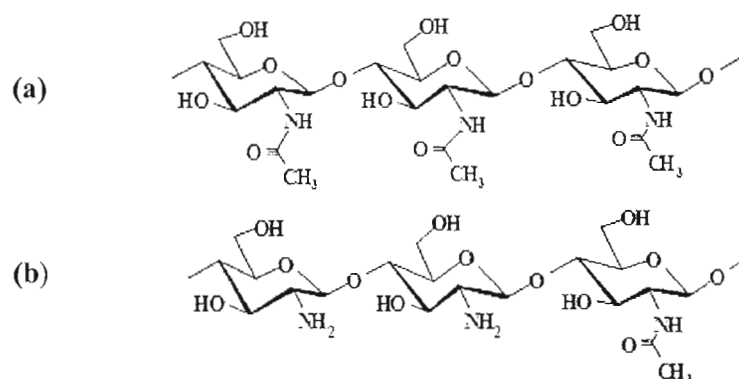


Figure 1.5: Structures chimiques de la chitine et du chitosane

(a) Chitine: unités de N-acétyl-D-glucosamine liées par des liaisons 1,4- β -glucosidiques, **(b)** Chitosane: unités de D-glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine liées par des liaisons 1,4- β -glucosidiques.

La réaction de déacétylation de la chitine génère des groupes amines (-NH_2), chargés positivement dans un milieu acide (-NH_3^+), conférant au chitosane une nature cationique, contrairement à la plupart des polysaccharides du même type qui sont très souvent neutres (amidon, cellulose) ou chargés négativement (alginate). La structure du chitosane est très similaire à celle de la cellulose, représentée par des unités de D-glucose, liées β -(1,4), avec des groupes hydroxyle à la position C-2 du glucose. En général, le chitosane commercial est amorphe, la cristallinité du polymère pouvant être augmentée par la précipitation du chitosane conventionnel d'une solution acide (Struszczyk, 1987). La masse moléculaire (MM) du chitosane et son degré de déacétylation (DDA) peuvent varier d'un chitosane à l'autre en fonction des types et des conditions des procédés de déacétylation. Le DDA du chitosane, exprimé en pourcentages de groupes amines libres présents dans la structure du polymère, est en général situé entre 70 et 95% et sa MM peut être comprise entre 10 000 Da et quelques millions de daltons (Roberts, 1992).

1.2.2 Les propriétés du chitosane

1.2.2.1 Le comportement dans un milieu aqueux

Le chitosane est soluble dans des solutions aqueuses acides et insoluble à un pH neutre ou alcalin. Dans un milieu acide, les groupes amines (-NH_2), présents à la position C-2 de l'unité répétitive de glucosamine, sont protonnés (-NH_3^+). Ainsi, à un pH acide, le chitosane devient soluble, présentant une densité de charge positive qui est en fonction du DDA (Rinaudo, Pavlov et Desbrieres, 1999). L'augmentation du DDA du chitosane augmente la viscosité d'une solution de chitosane à cause de l'augmentation du nombre des groupes libres d'amine. La viscosité d'une solution de chitosane est aussi affectée par d'autres facteurs comme la concentration et la température: la viscosité augmente avec l'augmentation de la concentration et la diminution de la température (Muzzarelli, 1977).

1.2.2.2 Les propriétés physico-chimiques

Certaines caractéristiques du chitosane, comme la MM et le DDA, ont une influence déterminante sur les propriétés physico-chimiques du polymère. La viscosité intrinsèque d'une solution de polymère est liée à sa masse moléculaire moyenne viscosimétrique (M_v) par l'équation Mark-Houwink-Sakurada:

$$\text{Viscosité intrinsèque} = k M_v^a$$

Les deux constantes (k , a) dépendent de polymère, des solvants utilisés et de la température. Les valeurs de k et a sont déterminées de façon expérimentale, en évaluant les viscosités intrinsèques des solutions des polymères pour lesquelles les masses moléculaires doivent être déterminées par une autre méthode. Les valeurs de ces constantes (k , a) varient de façon significative pour un domaine large de MM de chitosane avec des DDA compris entre 40% et 100% (Knaul *et al.*, 1998). La masse moléculaire viscosimétrique se détermine par l'équation Mark-Houwink-Sakurada, en connaissant les valeurs des constantes k et a et la valeur de la viscosité intrinsèque du chitosane (déterminée comme étant le point d'intersection de la régression linéaire de la viscosité réduite versus concentration de chitosane, extrapolée pour la valeur zéro de la concentration de chitosane).

Le chitosane est un polymère hydrophile qui retient l'eau dans sa structure en formant des gels, surtout dans un milieu acide, à cause de sa nature cationique. Ainsi, dans un milieu acide, le chitosane retarde la libération des médicaments (Kawashima *et al.*, 1985). Toutefois, Akbuga (1993) a reporté que le chitosane ne présente pas des propriétés de retardement à un pH plus élevé (pH 7.4), ce qui indique que les effets de retard du chitosane dépendent du pH. La libération des médicaments à partir des formulations de chitosane est aussi dépendante de sa MM et son DDA. Dans un milieu acide, cette libération est efficacement retardée par les hautes MM de chitosane (Kristl *et al.*, 1993) à cause de l'augmentation de la viscosité des gels formés par chitosane, et

par l'augmentation de son DDA (Sabnis, Rege et Block, 1997), à cause de l'augmentation du nombre des groupes amines ionisables et, respectivement, de la formation d'une barrière de gel de chitosane. La viscosité des gels formés augmente aussi avec l'augmentation du DDA du chitosane. Sabnis et ses collaborateurs (1997) ont suggéré que la libération du principe actif peut être aussi retardée par des possibles interactions entre le médicament et les groupements positifs du chitosane.

Le chitosane présente des propriétés de mucoadhésion et le principal mécanisme d'action au niveau moléculaire est de type électrostatique (Sogias, Williams et Khutoryanskiy, 2008) entre les groupes amines du chitosane, chargés positivement, et les groupes chargés négativement de la mucine (*i.e.* acide sialique). Lorsque le mécanisme d'adhésion implique des interactions électrostatiques, le pH du milieu est important. Ainsi, les interactions sont fortes à un pH acide et moins fortes à un pH plus élevé, à cause de la densité différente de charge du chitosane. En même temps, les propriétés adhésives du chitosane devraient être plus accentuées avec l'augmentation du DDA. La MM du chitosane joue aussi un rôle important dans le processus de mucoadhésion, l'augmentation de la MM ayant comme résultat une meilleure adhésion du polymère (Qaqish et Amiji, 1999). D'autres mécanismes sont aussi impliqués dans le processus de mucoadhésion du chitosane, comme la présence des liens d'hydrogène entre le chitosane et le mucus (Qaqish et Amiji, 1999; Sogias, Williams et Khutoryanskiy, 2008).

1.2.2.3 Les propriétés complexantes

Complexes polyélectrolytiques

Pour éviter l'utilisation des agents de réticulation, des interactions directes entre les charges opposées des chaînes polymériques (*i.e.* complexes polyélectrolytiques) ont été envisagées. Le chitosane a un pK_a d'approximativement 6.5. À un pH inférieur à la

valeur de son pK_a , le polymère est chargé positivement à cause de la protonation des groupes amines. Ainsi, la nature cationique du chitosane permet la formation de complexes polyélectrolytiques avec des polymères anioniques. Le chitosane a été associé avec les polyanions naturels comme le carboxyméthyl cellulose (Fukuda, 1980), l'alginate (Liao *et al.*, 2005), le dextrane sulfaté (Schatz *et al.*, 2004), le carrageenane (Tapia *et al.*, 2004), la pectine (Bernabé, Peniche et Arguelles-Monal, 2005), le xanthane (Dumitriu *et al.*, 1994), le sulfate de chondroïtine et le hyaluronate (Chen *et al.*, 2005; Denuziere, Ferrier et Domard, 1996). Le chitosane, chargé positivement, forme aussi des complexes polyélectrolytiques avec les plasmides, qui possèdent des charges négatives, en les protégeant ainsi contre l'attaque enzymatique des ADNases (MacLaughlin *et al.*, 1998).

La stabilité et les caractéristiques des complexes polyélectrolytiques dépendent de leur composition, de la MM et de la densité en charge positive (DDA) du chitosane. Ainsi, Mi et ses collaborateurs (1997) ont rapporté l'alginate comme étant un polyélectrolyte anionique qui peut contrôler le gonflement et l'érosion des comprimés de chitosane dans un milieu acide. Pour les MM petites de chitosane, la diminution du DDA (diminution des groupes amines) a comme résultat une diminution significative de la capacité du chitosane de former des complexes chitosane - alginate, tandis que pour les MM grandes de chitosane, la diminution du DDA n'a qu'un effet mineur (Gaserod, Smidsrod et Skjak-Braek, 1998). Le pH du milieu a aussi un effet sur la formation des complexes électrolytiques, en affectant la densité des charges sur les polyélectrolytes. La Figure 1.6 (a,b) présente, de façon schématique, les interactions ioniques entre alginate et chitosane.

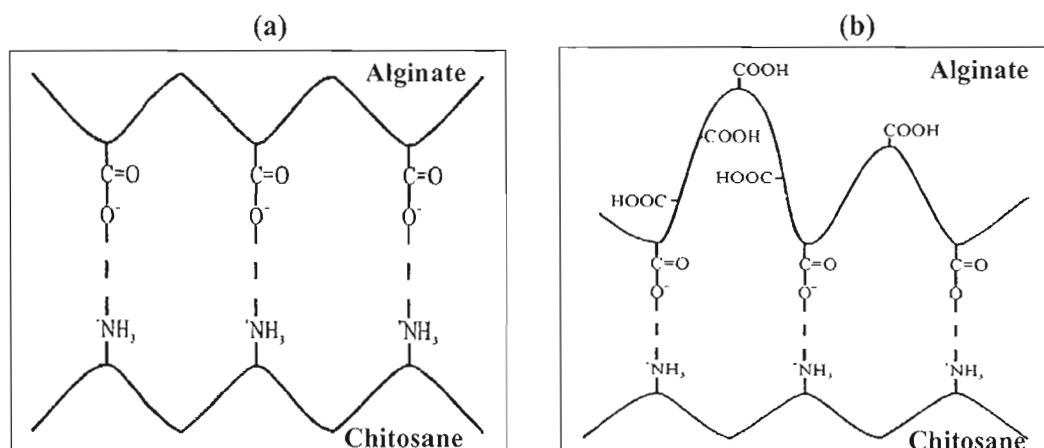


Figure 1.6: Représentation schématique des interactions ioniques entre alginate et chitosane (d'après Kumar, 2000)
 (a) pH 5.4, (b) pH 2.0.

1.2.2.4 Activité antibactérienne

Concernant l'activité antibactérienne du chitosane, plusieurs mécanismes ont été proposés. Le mécanisme le plus accepté serait la formation des complexes de polyélectrolytes entre les groupes cationiques du chitosane ($-\text{NH}_3^+$) et les groupes anioniques présents à la surface cellulaire des bactéries. Ceci peut altérer la perméabilité de la membrane cellulaire et déterminer la perte des substances intracellulaires (lactate dehydrogenase, glucose), inhibant ainsi le métabolisme normal et la croissance des bactéries, ce qui détermine leur mort (Helander *et al.*, 2001; Tsai et Su, 1999). Le chitosane a une activité antibactérienne plus grande que les oligomères de chitosane (qui peuvent être des nutriments pour les bactéries), et son activité bactéricide est plus forte pour les bactéries gram-positives que pour celles gram-négatives (No *et al.*, 2002). L'activité antibactérienne du chitosane est aussi affectée par le pH du milieu, étant élevée à un pH acide et partiellement inhibée en présence de certains ions en solution, grâce à la capacité du polymère de complexer les ions métalliques (Chung *et al.*, 2003). Son activité bactéricide peut aussi varier en fonction

de la complexité des systèmes utilisés, étant plus élevée dans des milieux simples que dans ceux complexes, à cause des possibles interactions du chitosane avec d'autres composés (Gil *et al.*, 2004).

1.3 Modifications chimiques de l'amidon et du chitosane

1.3.1 Dérivés d'amidon

Pour augmenter les performances de l'amidon natif, plusieurs modifications par des traitements physiques ou chimiques peuvent être réalisées, conférant à l'amidon des propriétés physico-chimiques désirées. Ainsi, l'amidon peut être modifié par des réactions de substitution de ses groupes hydroxyle, son caractère hydrophile pouvant ainsi être augmenté ou diminué. En utilisant l'acide monochloracétique comme agent de substitution, des groupements carboxyliques ionisables sont introduits sur l'amidon (Figure 1.7) pour augmenter sa solubilité dans un milieu aqueux neutre. En même temps, des chaînes latérales plus longues, comme les groupements carboxyéthyle, carboxypropyle, peuvent aussi être introduites.

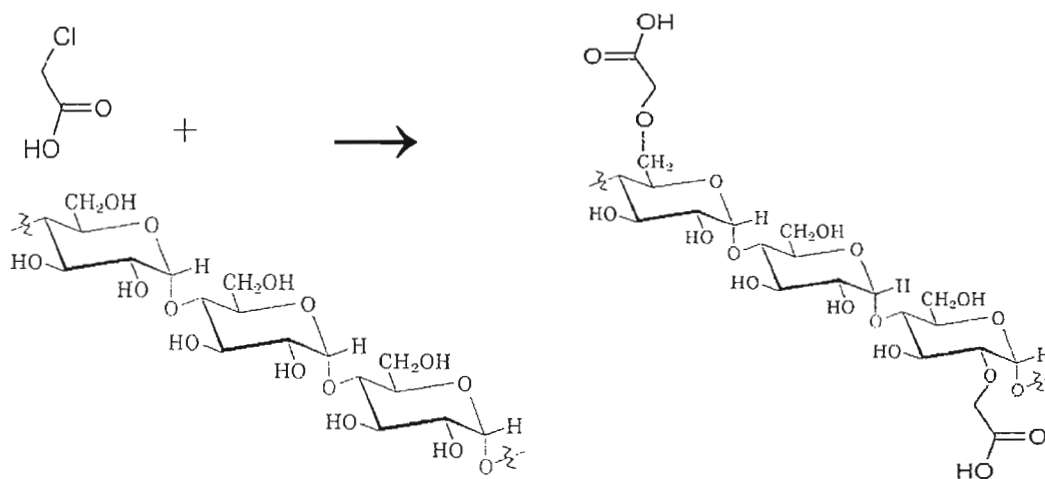


Figure 1.7: Représentation schématique de la réaction de substitution de l'amidon par l'acide monochloracétique.

Des dérivés avec des différentes solubilités peuvent être obtenus en modifiant le degré de substitution de l'amidon. Il est connu que les propriétés de gonflement des polymères qui présentent des groupements ioniques dépendent du pH et de la force ionique du milieu (Mulhbachter *et al.*, 2001; Mulhbachter, Ispas-Szabo et Mateescu, 2004). Ainsi, les fonctions acides (*i.e.* carboxyméthyle) présentes sur le polymère contribuent à l'augmentation du volume de gonflement avec l'augmentation du pH, tandis que dans le cas des polymères substitués avec des groupements basiques (*i.e.* aminoéthyle), le volume de gonflement diminue à pH élevé (Mulhbachter *et al.*, 2001). Le degré hydrophile de l'amidon est modifié par l'anhydride acétique, l'oxyde de propylène et le 1-chloropropane. Plusieurs groupements comme hydroxyalkyle, méthyle, diéthylamino(hydroxy)propyle peuvent être aussi insérés sur l'amidon en modifiant son degré hydrophile. D'autres substituants organiques sont aussi utilisés, tels que l'acide acrylique, l'acrylamide, l'acrylate d'éthyle, de même que des substituants non organiques comme le sulfate et le phosphate (BeMiller, 1973).

L'amidon peut être modifié chimiquement par réticulation covalente ou ionique avec différents agents réticulants comme l'épichlorhydrine, le trimétaphosphate trisodique, l'oxychlorure de phosphore ou d'autres agents polyfonctionnels. L'amidon peut aussi être réticulé avec des cations capables d'interagir avec les groupements hydroxyle. L'agent de réticulation s'interpose entre les chaînes glucosidiques et peut créer un réseau tridimensionnel insoluble, la solubilité de l'amidon réticulé diminuant avec l'augmentation du degré de réticulation (Lenaerts, Dumoulin et Mateescu, 1991). La technologie Contramid® (Mateescu, Lenaerts et Dumoulin, 1994) est représentée par un amidon riche en amylose, faiblement réticulé. L'amylose réticulé est reconnu et hydrolysé sélectivement par l'alpha-amylase (Dumoulin, Cartilier et Mateescu, 1999; Mateescu et Schell, 1983), ce qui peut présenter un rôle important pour les formulations pharmaceutiques orales.

Pour les matrices à base d'amidon réticulé, le temps de libération du principe actif dépend du degré de réticulation de l'amidon, en atteignant un maximum pour un degré modéré de réticulation et en diminuant par la suite pour des degrés de réticulation plus élevés (Figure 1.8; Dumoulin *et al.*, 1998; Ispas-Szabo *et al.*, 2000). La réticulation affecte le degré d'ordre du réseau cristallin. Ainsi, pour des degrés faibles de réticulation, l'association intra- et inter- chaînes est favorisée, en réduisant le nombre des groupements hydroxyle qui peuvent interagir avec les molécules d'eau, la matrice étant ainsi plus résistante à l'hydratation. Ainsi, les régions ordonnées, stabilisées par des ponts d'hydrogène, sont majoritaires au niveau de la matrice, ce qui empêche le gonflement du comprimé dans un milieu aqueux (Figure 1.9a). C'est à partir de ces matrices qu'on obtient la plus longue libération d'un médicament.

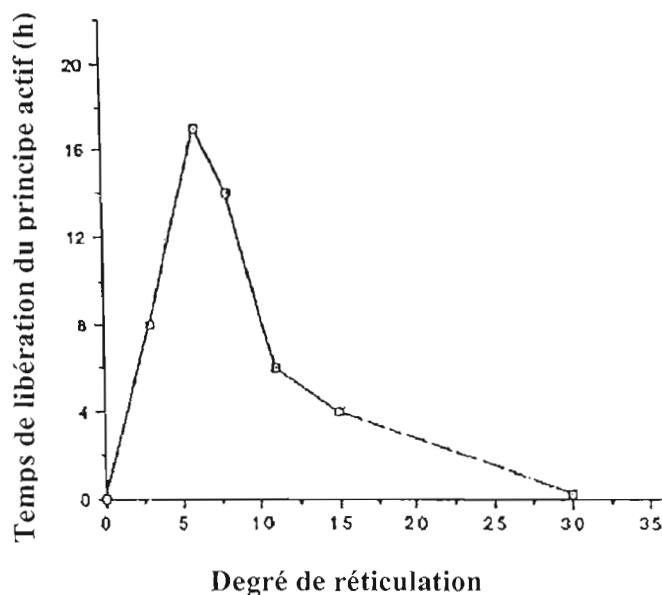


Figure 1.8: Représentation graphique du temps de libération d'un principe actif (théophylline) en fonction du degré de réticulation de l'amidon
(adaptation d'après Dumoulin *et al.*, 1998).

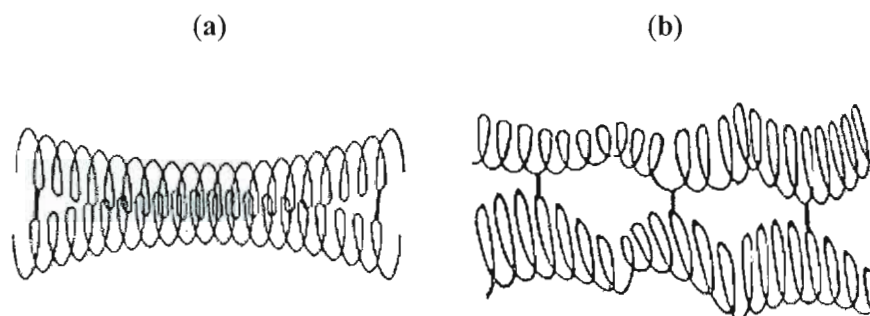


Figure 1.9: Représentation schématique de la stabilisation de l'amylose réticulé
(a) faiblement réticulé et **(b)** hautement réticulé
 (d'après Dumoulin *et al.*, 1998).

Pour des degrés faibles-modérés de réticulation, les régions amorphes de la matrice polymérique sont mieux représentées, en stabilisant la structure de la matrice polymérique lors du gonflement et permettant une libération progressive du principe actif. Les propriétés de libération (*i.e.* temps de libération, gonflement) sont maximales lorsque le taux de réticulation permet assez de flexibilité des chaînes pour permettre la formation des liens d'hydrogène (liens physiques). Ainsi, la libération du médicament peut être partiellement contrôlée par la pénétration de l'eau avec la formation des nouvelles associations eau - amylose (ponts d'hydrogène) qui peuvent remplacer les ponts d'hydrogène entre les chaînes amylose - amylose (Lenaerts, Dumoulin et Mateescu, 1991). Finalement, pour des degrés de réticulation élevés, la stabilisation par ponts d'hydrogène entre les chaînes est empêchée et, ainsi, les groupements hydroxyles de l'amidon s'hydratent plus facilement, en ayant comme résultat la destruction de la structure du comprimé et la libération rapide du principe actif (Figure 1.9b). En effet, l'augmentation du taux de réticulation a comme résultat une modification profonde de la structure native de l'amylose et une diminution de la capacité de l'amylose à former des ponts d'hydrogène qui stabilise les doubles hélices.

Les comprimés à base d'amidon réticulé peuvent contrôler la libération de médicament sur des périodes de 18-24 h, pour une charge maximale de médicament allant jusqu'à 20%. La substitution partielle des groupes hydroxyle de l'amidon réticulé avec des groupements ioniques, *i.e.* carboxyméthyle, aminoéthyle, ou avec des groupements de type acétate permet une augmentation de la capacité de charge en médicament de la matrice de jusqu'au 60 % (Mulhbacher *et al.*, 2001). Ces matrices ont été préalablement utilisées pour la libération contrôlée de médicament sur des périodes de 20 h, les dérivés d'amidon avec des groupements carboxyliques ou amine étant capables de moduler la libération du médicament par des interactions ioniques, tandis que les dérivés contenant des groupements de type acétate pouvant moduler la libération du médicament par l'augmentation du caractère hydrophobe de la matrice (Mulhbacher *et al.*, 2001; Mateescu, Ispas-Szabo et Mulhbacher, 2006).

1.3.2 Dérivés de chitosane

Le chitosane a un groupe amine ($-NH_2$) et deux groupes hydroxyle ($-OH$) sur chaque unité répétitive de glucosamine. Les propriétés physico-chimiques du chitosane peuvent être changées en faisant des modifications chimiques sur les groupes amine ou hydroxyle, ce qui amène fréquemment à un changement conformationnel du polymère. Ainsi, des réactions d'éthérisation ou d'estérification peuvent être réalisées sur les groupes hydroxyle du chitosane. Toutefois, les modifications chimiques du chitosane sont, en général, spécifiques pour les groupes amine, la N-acylation et la réaction Schiff étant les plus importantes (Kumar, 2000). Ainsi, suite à la N-acylation du chitosane avec des anhydrides acides, des groupes amides sont introduits dans la structure du chitosane. Le chitosane a été aussi N-acylé avec des chaînes d'acides gras de différentes longueurs (Le Tien *et al.*, 2003). Le carboxyméthyl chitosane (CM-Chitosane) est l'un des dérivés anioniques du chitosane le plus étudié. L'addition des groupes carboxyle ($-COOH$) sur le chitosan change les propriétés du chitosan, devenant soluble même à des pH physiologiques et légèrement basiques (Thanou,

Verhoef et Junginger, 2001). Le chitosane peut former des imines avec les aldéhydes ou les cétones. Différents agents chimiques (*i.e.* dialdéhydes, épichlorhydrine, sodium trimétaphosphate) peuvent aussi réticuler le chitosane, avec la formation des réseaux covalents ou ioniques (Berger *et al.*, 2004). Ceci permet l'amélioration de la résistance mécanique et celle liée à l'hydrolyse des matrices à base de chitosane réticulé. En général, plusieurs agents de réticulation (*i.e.* dialdéhydes, épichlorhydrine) présentent une toxicité élevée.

1.4 L'amidon et le chitosane dans le domaine pharmaceutique et médical

1.4.1 L'amidon

Grâce à sa disponibilité commerciale et à son coût réduit, l'amidon est un polymère naturel idéal qui peut être utilisé comme matière première pour le développement des systèmes de transport et libération des différents agents administrés par la voie orale. Ainsi, la technologie Contramid[®] a été proposée comme matrice pour des systèmes à libération contrôlée des principes actifs sur une période de temps allant jusqu'à 24 h (Lenaerts *et al.*, 1991; Mateescu, Lenaerts et Dumoulin, 1994). L'amidon riche en amylose, réticulé à un degré de réticulation plus élevé, a été proposé comme agent désintégrant (Cartilier *et al.*, 1994; Dumoulin *et al.*, 1994). Cette technologie porte le nom commercial de Liamid[®].

Pour des agents actifs avec une faible solubilité ou avec des temps de dissolution trop longs, une nouvelle approche de libération de médicament, contrôlée enzymatiquement, a été proposée (Mateescu *et al.*, 1992; Dumoulin, Cartilier et Mateescu, 1999). Le système consiste à ajouter de l'alpha-amylase à l'intérieur des comprimés à base de Contramid[®], ce qui permet de moduler, par sa fonction endo-amylasique, le temps de libération des médicaments en fonction de l'objectif désiré. L'amidon est aussi utilisé comme agent liant, pour garantir l'obtention d'une structure

compacte, et de remplissage, pour créer de la masse et générer des propriétés de fluidité lors de la préparation des comprimés ou des capsules. La capacité des dérivés d'amidon de former des films est utile dans le processus d'enrobage des comprimés (Tuovinen, Peltonen et Jarvinen, 2003). Les matrices qui ont à la base l'amidon riche en amylose, réticulé, peuvent être également utilisées comme implants lorsqu'elles sont caractérisées par une érosion minimale (Désévaux, Dubreuil et Lenaerts, 2002). Tel que décrit à la section 1.3.1, les dérivés d'amidon réticulé (*i.e.* carboxyméthyl amidon, aminoéthyl amidon) peuvent aussi être utilisés comme matrices pour moduler la libération de différents principes actifs administrables par voie orale (Mulhbacher *et al.*, 2001; Mateescu, Ispas-Szabo et Mulhbacher, 2006).

Grâce à sa capacité de former des complexes avec des différentes molécules, l'amidon est aussi utilisé comme antimicrobien lorsqu'il est complexé avec l'iode (BeMiller, 1973). De plus, l'amidon phosphorylé, marqué au radio-isotope ^{99m}Tc , peut servir comme agent diagnostique et l'amidon sulfaté, pour traiter les ulcères de l'estomac. Ce dernier dérivé de l'amidon prévient la formation des lésions gastriques en inhibant l'action de la pepsine et son processus de formation (Ravin, Baldinus et Mazur, 1962).

1.4.2 Le chitosane

Le chitosane est un polymère biodégradable et biocompatible (Hirano *et al.*, 1990; Muzzarelli *et al.*, 1988). Les résultats des essais de toxicité chez les rongeurs ont montré que le chitosane administré par la voie orale est non-toxique. Ainsi, l'administration de 15 g/kg chez les rats (Wistar) pour une période de 14 jours n'a pas eu d'effets toxiques (Knapczyk *et al.*, 1989). Chez la souris, la dose létale ($\text{DL}_{50\%}$) du chitosane a été rapportée comme étant plus élevée que 16g/kg. La consommation régulière de chitosane peut avoir certains effets, comme, par exemple, une certaine perte de poids grâce à ces capacités de lier les lipides (Shahidi, Arachchi et Jeon, 1999;

Sugano *et al.*, 1978). Toutefois, les quantités de chitosane nécessaires dans les formulations pharmaceutiques sont assez faibles, et ses effets restent très réduits.

Grace à son caractère polycationique, le chitosane forme des gels dans un milieu acide, comme celui de l'estomac, ce qui rend intéressante son utilisation pour le transport et la livraison des principes actifs administrables par la voie orale. Ainsi, le chitosane peut constituer une excellente matrice hydrophilique pour le transport et le relargage des différents principes actifs, en retardant la libération des médicaments formulés sous forme de comprimés (Kawashima *et al.*, 1985), granules (Hou *et al.*, 1985) et microparticules (Thanoo, Sunny et Jayakrishnan, 1992). Le chitosane a été aussi évalué *in vitro* comme transporteur des médicaments sous forme d'hydrocolloïdes et de gels (Kristl *et al.*, 1993). Grace à sa capacité d'absorber l'eau, le chitosane peut être utilisé comme désintégrant dans la formulation des comprimés (Ritthidej *et al.*, 1994). Des nombreuses études ont montré que les chitosanes et leurs dérivés présentent des propriétés bioadhésives qui permettent d'augmenter le temps de contact et favorisent l'absorption des peptides et des protéines à travers les muqueuses en augmentant la perméabilité de l'épithélium via l'ouverture des jonctions serrées (Artursson *et al.*, 1994; Dodane, Amin et Merwin, 1999; Hidalgo, Raub et Borchardt, 1989; Thanou, Verhoef et Junginger, 2001). Ainsi, l'association des vaccins aux chitosanes ou à leurs dérivés sous forme de nano- et microparticules, s'est révélée efficace pour améliorer la réponse immune au niveau des muqueuses et systémique (Van der Lubben *et al.*, 2001a,b). Dans ces conditions, le chitosane pourrait fonctionner lui-même comme adjuvant pour des vaccins à administration par voie mucosale.

Dans d'autres travaux, le chitosane a été proposé comme excipient pour des systèmes de libération des médicaments par voie transdermique (Thacharodi et Rao, 1995), comme matériel hémostatique, sous forme des gels ou des éponges (Hoekstra, Struszczyk et Kivekas, 1998; Rao et Sharma, 1997), comme matériel pour sutures, sous

forme de fibres (Qin et Agboh, 1998), en contribuant à la guérison des plaies (Ueno, Mori et Fujinaga, 2001). Le chitosane peut présenter des applications dans le domaine de l'ophtalmologie grâce à son effet antibactérien, à ses propriétés intéressantes dans le processus de guérison et à sa capacité de former des films (Felt *et al.*, 1999). Grâce aux bio-activités spécifiques du chitosane, ses formulations des différents principes actifs peuvent avoir double effets thérapeutiques.

CHAPITRE II

SYSTÈMES DE TRANSPORT ET DE LIVRAISON DES MÉDICAMENTS ET DES AGENTS BIOACTIFS ADMINISTRABLES PAR VOIE ORALE

La voie orale est la plus répandue pour l'administration des nombreux médicaments et des principes bioactifs. Le type de thérapie recherchée, chronique ou aiguë, le site spécifique ciblé par l'agent actif ou son taux de libération, sont des facteurs très importants dans le choix d'un système administrable par la voie orale. La vitesse de transit gastro-intestinal d'un système de libération dépend de la forme, la dimension, les propriétés adhésives de la forme de dosage (comprimé, capsule), mais aussi de la longueur, la forme et la motilité du tractus gastro-intestinal. La nature du polymère et de l'agent actif, les interactions de l'agent actif avec la matrice, la solubilité de l'agent actif dans le milieu aqueux et la géométrie du système se retrouvent à la base des profils de libération des médicaments.

Historiquement, plusieurs types de formulations pharmaceutiques ont été développés, notamment des formulations conventionnelles (classiques), des formulations qui assurent la livraison immédiate ou une libération retardée ou contrôlée du principe actif sur une durée de 24 heures (Figure 2.1a,b).

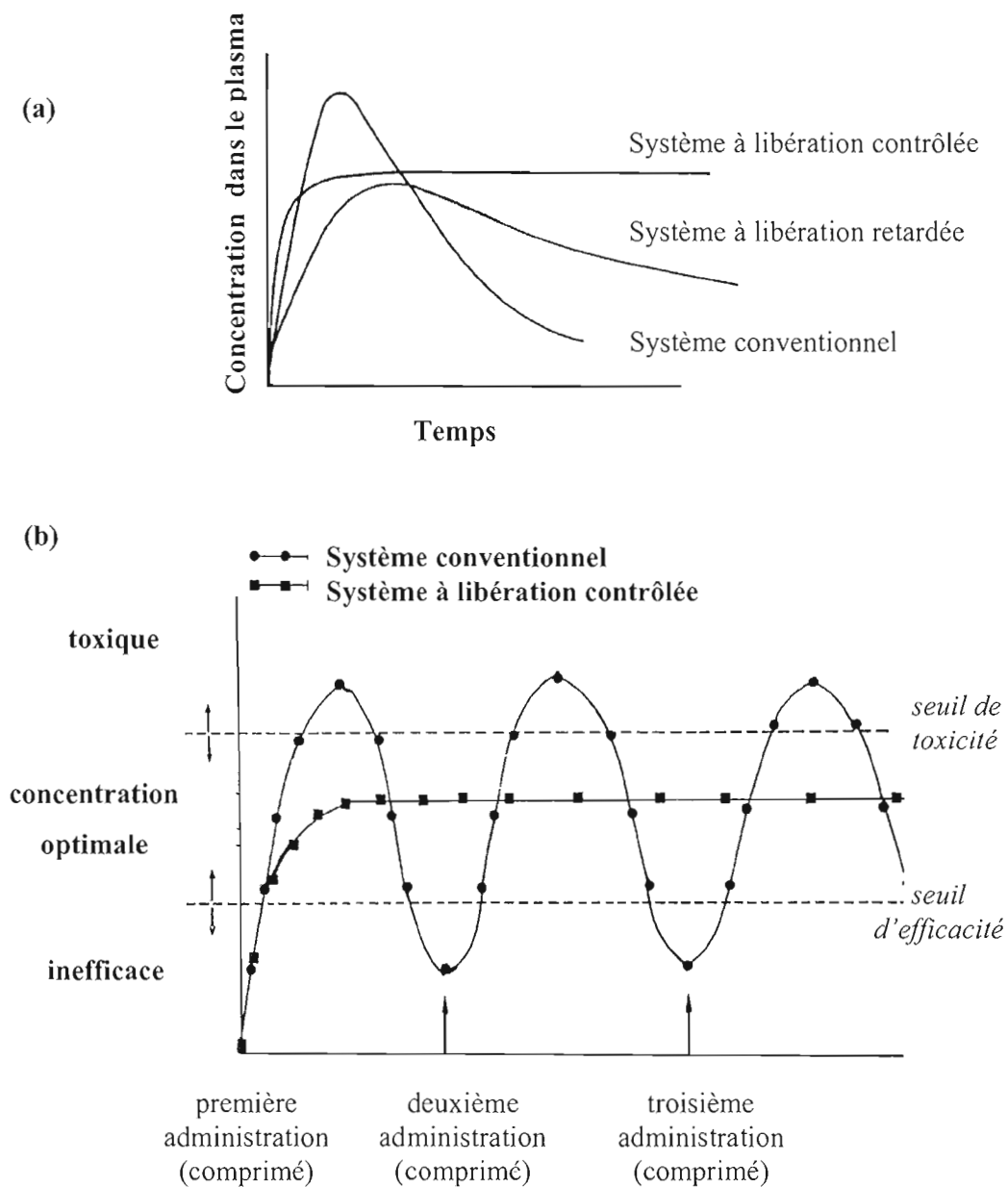


Figure 2.1: Variation de la concentration plasmatique d'un principe actif en fonction du système d'administration. Représentation schématique: (a) profils de concentration d'un principe actif administré sous forme de système conventionnel, à libération retardée et contrôlée (*adaptation d'après Li, Robinson et Lee, 1987*), (b) concentration sanguine de médicament suite à l'administration des comprimés conventionnels et à libération contrôlée (*d'après Hsieh, 1988*).

Les formes pharmaceutiques classiques administrées par la voie orale n'offrent aucun contrôle pendant le processus de libération d'un principe actif, le *seuil de toxicité* (la concentration sanguine en principe actif à laquelle le médicament devient toxique) et son élimination étant atteints assez rapidement après leur administration. Après un intervalle de temps court, une autre dose de médicament doit être administrée, car son concentration diminue en bas du *seuil d'efficacité* (la concentration sanguine minimale de médicament pour que le traitement soit efficace). Différemment de ces formulations conventionnelles, les systèmes pharmaceutiques à libération contrôlée libèrent le principe actif avec une vitesse bien déterminée durant des longues périodes de temps.

2.1 La libération contrôlée des agents actifs

Les systèmes pharmaceutiques à libération contrôlée sont des formes modernes de livraison des principes actifs qui ont à la base un contrôle temporel ou spatial (ou les deux ensemble) du processus de libération (Li, Robinson et Lee, 1987). Ces systèmes ont le rôle de contrôler et maintenir les concentrations d'un principe actif dans le sang ou dans les tissus cibles de l'organisme. Idéalement, la concentration d'un médicament dans le sang doit se situer entre le seuil d'efficacité et le seuil de toxicité, c'est-à-dire à l'intérieur de la fenêtre thérapeutique (Hsieh, 1988).

2.1.1 Formulations pharmaceutiques à libération contrôlée

2.1.1.1 Systèmes à libération contrôlée par gonflement

En général, les systèmes à libération contrôlée par le gonflement sont représentés par les systèmes matriciels qui contiennent le principe actif uniformément dispersé à son intérieur. En contact avec le milieu de dissolution, la matrice polymérique s'hydrate rapidement (ceci peut impliquer un certain gonflement de la matrice) et

gène une barrière gélifiante à travers laquelle l'agent actif diffuse vers le milieu de dissolution (Figure 2.2a); c'est le cas du système Contramid® (Lenaerts, Dumoulin et Mateescu, 1991; Mateescu, Lenaerts et Dumoulin, 1995). Le système matriciel peut garder son intégrité (matrice insoluble avec un gonflement limité) ou peut se solubiliser totalement (dissolution). Ainsi, la vitesse de libération du principe actif est dépendante de la vitesse d'hydratation du système matriciel (le taux du gonflement) et / ou de la vitesse de dissolution de la matrice.

2.1.1.2 Systèmes à libération contrôlée par diffusion

Le transport d'un médicament à travers un système à libération contrôlée dépend de la solubilité du médicament, du taux de gonflement et de la taille des pores du système et des interactions chimiques entre le médicament et le système. Les deux grandes catégories de systèmes à libération contrôlée par la diffusion sont représentées par les systèmes de type matriciel ou réservoir (Kost et Langer, 1987; Zeoli et Kydonieus, 1983).

Le système de type matriciel avec libération contrôlée par diffusion (*i.e.* système monolithique) est constitué d'une matrice sous forme de réseau qui contient le médicament dispersé de façon homogène à son intérieur. Au fur et à mesure que la matrice s'hydrate, l'eau solubilise le principe actif qui diffuse à travers la matrice (Figure 2.2b). Ainsi, la diffusion du principe actif se fait par les pores remplis d'eau de la matrice hydratée et la vitesse de libération du médicament est en fonction de la vitesse de diffusion du médicament à travers la matrice gélifiée (Kost et Langer, 1987).

Pour les systèmes à libération contrôlée de type réservoir, l'agent actif est entièrement contenu dans un compartiment interne recouvert par une membrane qui s'hydrate et devient perméable en contact avec le milieu de dissolution (Figure 2.2b).

La libération du médicament dépend de la vitesse d'accès du solvant qui peut varier en fonction des pores du système et de son degré d'hydrophobicité (Ranade et Hollinger, 1996).

2.1.1.3 Systèmes à libération contrôlée par érosion

L'érosion chimique et enzymatique

L'érosion des systèmes matriciels (*i.e.* comprimés) dans les milieux de dissolution peut être chimique et/ou enzymatique. La façon la plus simple d'obtenir un système de libération érodable (Figure 2.2c) est de formuler le principe actif avec un polymère naturel ou synthétique qui est soluble dans un milieu aqueux et de laisser la formulation se dissoudre dans ce milieu (Heller *et al.*, 1978). La matrice polymérique peut aussi être dégradée par les enzymes du tractus gastro-intestinal et le principe actif peut être libéré à l'extérieur du comprimé à mesure que la matrice est dégradée. Ceci fait que la libération du principe actif est contrôlée par la vitesse de clivage enzymatique des liaisons constituant la matrice. Pour contrôler la dissolution dans le temps, différents molécules hydrophobiques peuvent aussi être ajoutées. Dans certains cas, le médicament peut aussi être lié au polymère par un lien covalent (*i.e.* complexes dextrane-antibiotique), et les conditions de liaison ne doivent pas modifier l'activité pharmacologique du médicament. Ainsi, la libération est contrôlée par la vitesse avec laquelle les liens covalents disparaissent par l'hydrolyse (Ranade et Hollinger, 1996).

Trois types de mécanismes d'érosion ont été proposés par Heller (1980). *Le type I d'érosion* inclue les polymères solubles dans l'eau qui ont été transformés en polymères insolubles par des ponts intermoléculaires (réticulation) et leur solubilisation se fait par l'hydrolyse de ces ponts intermoléculaires (*i.e.* la gélatine réticulée). *Le type II d'érosion* inclue les polymères qui sont initialement insolubles dans l'eau, mais qui deviennent solubles par ionisation (*i.e.* l'alginate est insoluble au

pH acide et devient soluble à pH basique). Finalement, *le type III d'érosion* est représenté par des polymères hydrophobes qui sont transformés en petites molécules hydrosolubles par scission des chaînes polymériques principales, tel que les polymères utilisés pour l'administration des agents actifs par la voie intra-musculaire et sous-cutanée, comme les implants. Le mécanisme d'érosion d'un système peut aussi être représenté par une combinaison de ces types et sa tendance peut être prévue en tenant compte du caractère hydrophobe et de la morphologie du polymère (Rosen *et al.*, 1988).

L'érosion physique

La libération des principes actifs peut aussi être contrôlée par la présence d'un champ magnétique. Ainsi, des microbilles magnétiques sont dispersées à l'intérieur d'une matrice qui contient le principe actif. En présence d'un milieu aqueux et d'un champ magnétique oscillant, la libération du médicament peut être accélérée, ce qui conduit à la concentration du principe actif dans le tissu ou l'organe cible (Figure 2.2c). La vitesse de libération du principe actif peut ainsi être contrôlée par l'intensité du champ magnétique externe (Langer, 1990). Ce type de thérapie est utile pour le traitement des tumeurs primaires qui sont bien localisées dans l'organisme.

En général, la libération d'un principe actif a à la base plusieurs mécanismes de libération combinés. Ainsi, pour les systèmes polymériques biodégradables, la libération d'un principe actif se fait par des mécanismes de gonflement, diffusion et érosion, et le mécanisme qui est le plus rapide devrait dominer les autres (Winzenburg *et al.*, 2004).

2.1.1.4 Systèmes osmotiques à libération contrôlée

Les principes physiques qui déterminent la performance de ce type de système ont été présentés antérieurement par Theewes (1975). Ainsi, les systèmes osmotiques élémentaires sont constitués d'une membrane qui entoure un compartiment de principe actif, qui est perméable à l'eau et imperméable au principe actif, et présente un ou plusieurs orifices / ouvertures. Dès que ce système se trouve dans le milieu du tractus gastro-intestinal, l'eau pénètre par la membrane et solubilise le médicament qui sort à l'extérieur par l'orifice de la membrane (Figure 2.2d). La libération du médicament est contrôlée par la vitesse avec laquelle l'eau entre dans le système, par la vitesse de solubilisation du médicament et par les dimensions de l'orifice membranaire et elle est indépendante de la motilité et du pH du tractus gastro-intestinal. Pour les médicaments qui ne présentent pas une bonne solubilité dans l'eau, d'autres systèmes osmotiques plus compliqués ont été développés. Ainsi, le système *OROS Push-Pull* présente à l'intérieur un compartiment *Push* et un ou plusieurs compartiments de médicament qui contiennent aussi des agents osmotiques et des agents de suspension. Le compartiment *Push* contient des agents osmotiques et des polymères qui gonflent. Le système est couvert par une membrane semi-perméable et présente un orifice. Une fois que l'eau entre dans le compartiment contenant le médicament, celui-ci sera suspendu dans le fluide. À l'arrivée de l'eau dans le compartiment *Push* (contenant le polymère qui gonfle), ce compartiment va augmenter son volume et, ainsi, va contribuer à la livraison de la suspension de médicament par l'orifice du système. Le système *L-OROS* contient à l'intérieur un gel avec le médicament dissout qui est couvert avec une membrane, une couche osmotique *Push* et, vers l'extérieur, avec une membrane semi-perméable. Le système présente aussi un orifice. Le système *EnSoTrol* est représenté par un seul compartiment (qui contient le médicament, l'agent osmotique et des substances qui contribuent à la solubilisation du médicament) couvert par une membrane semi-perméable qui présente un orifice. L'eau entre dans le système par la membrane, solubilise le médicament et la solution de médicament est livrée par l'orifice du système (Bhatt, 2004).

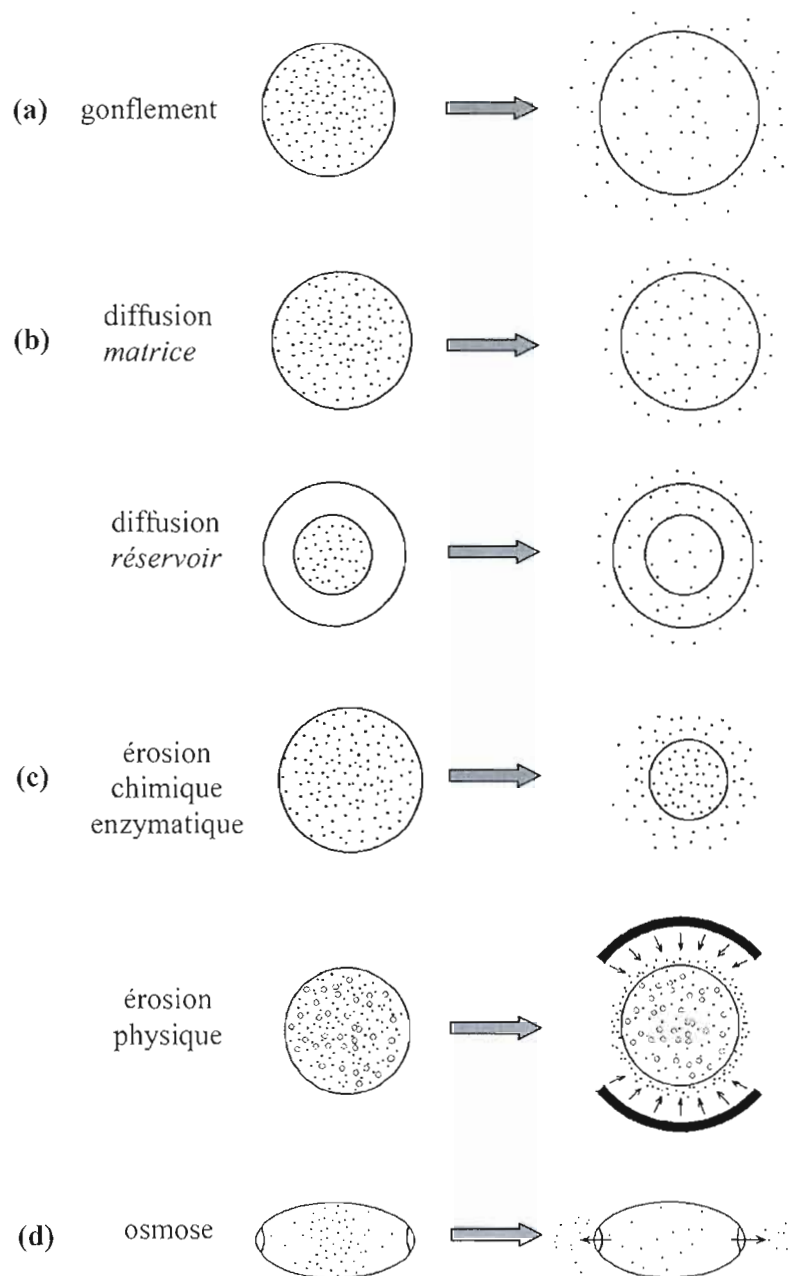


Figure 2.2: Représentation schématique des différents systèmes à libération contrôlée (*adaptation d'après Langer, 1990*). Systèmes à libération contrôlée par gonflement (a), diffusion (b), érosion (c) et osmose (d). Médicament (•); micro-billes magnétiques (◐).

2.1.2 La cinétique de libération des médicaments

L'analyse des paramètres cinétiques pour la libération d'un principe actif peut être réalisée selon l'équation de diffusion adaptée par Peppas (1985).

$$M_t/M_\infty = kt^n$$

où : M_t = quantité de médicament libéré au temps t ,

M_∞ = quantité totale de médicament libéré,

k = constante cinétique,

t = temps,

n = constante.

La valeur de la constante n indique le type de transport qui est à la base de la libération du médicament. Pour $n = 0,5$, la libération d'un médicament suit un mécanisme de diffusion fickienne (la vitesse de relaxation des chaînes de polymère est supérieure à la mobilité de l'espèce diffusante). Pour $0,5 < n < 1$, la cinétique de libération est intermédiaire entre celle de diffusion fickienne et celle d'ordre zéro (linéaire). Finalement, pour $n = 1$, il s'agit d'un transport de cas II (cinétique de libération linéaire) et, pour $n > 1$, le transport est de type super cas II (cinétique de libération croissante en fonction du temps). L'équation s'applique pour le calcul des paramètres cinétiques, mais elle ne permet pas de déterminer si ceux-ci sont la résultante de plusieurs mécanismes.

2.2 Le relargage ciblé des agents actifs

Les systèmes pharmaceutiques à libération contrôlée sont impliqués dans la libération des médicaments avec une vitesse constante, sur une durée de 18-24 heures et plus de libération. Toutefois, la majorité des agents bioactifs ont des sites spécifiques au niveau du tractus gastro-intestinal. Dans ce cas, la libération contrôlée pour des

longues périodes de temps n'est plus utile, surtout parce que seulement la fraction d'agent actif qui se trouve au niveau de la fenêtre thérapeutique est utilisée, tandis que l'autre fraction est éliminée. Ainsi, pour un bon nombre d'agents bioactifs, il est plutôt préférable d'avoir des systèmes de livraison à des sites spécifiques, à l'intérieur d'une fenêtre thérapeutique, que d'avoir des systèmes à libération contrôlée pour des longues périodes. Les systèmes de livraison devraient libérer le principe actif seulement à l'endroit ciblé dans une période de temps qui peut être de courte ou de longue durée en fonction de l'emplacement de chaque site ciblé (petit intestin ou côlon).

2.2.1 La libération des principes actifs au niveau de l'intestin

Les systèmes de livraison au niveau de l'intestin devraient retarder la libération d'un principe actif au niveau de l'estomac pour permettre ensuite leur libération au niveau du petit intestin et/ou du côlon. La libération retardée est aussi appelée libération contrôlée dans le temps et peut impliquer un certain temps de latence suivi par une libération rapide et complète d'un principe actif (libération pulsée) ou par une libération contrôlée de plus ou moins longue durée. Les mécanismes les plus connus pour la libération des principes actifs au niveau de l'intestin sont dépendants du pH, du temps (petit intestin et côlon), de la pression et de la présence de la microflore intestinale (côlon).

2.2.1.1 Systèmes à libération dépendante de pH

Le recouvrement gastro-résistant des formulations pharmaceutiques avec des polymères sensibles au pH (enrobage entérique) est fréquemment utilisé pour la livraison des principes actifs au niveau du petit intestin. Ces polymères d'enrobage sont en général résistants dans les conditions acides de l'estomac et peuvent se dissoudre dans un environnement avec un pH plus élevé (Figure 2.3a). Le même principe a été aussi appliqué pour la livraison des actifs au niveau du côlon (Tuleu *et*

al., 2001). Les polymères les plus utilisés pour réaliser l'enrobage sont représentés par des dérivés de l'acide polyacrylique (Eudragit®) et des dérivés de la cellulose. Les polymères à base d'Eudragit® sont des copolymères de l'acide acrylique et méthacrylique, présentant différentes propriétés physico-chimiques qui sont déterminées par la présence de différents groupements fonctionnels. Ainsi, les copolymères d'Eudragit présentant des groupes fonctionnels de type carboxyle (*i.e.* Eudragit® L100 / S 100 / L 100-55) offrent des propriétés de gastro-résistance, en étant solubles dans les conditions entériques. La valeur du pH pour lequel l'enrobage commence à se solubiliser dépend de chaque enrobage choisi: pH 5.5 pour *Eudragit® L100-55*, pH 6.0 pour *Eudragit® L100*, pH 7.0 pour *Eudragit® S100*, pH 4.5-4.8 pour *hydroxypropylméthyl cellulose phthalate*, pH 5.4 pour *hydroxypropylméthyl cellulose phthalate-55* (Chourasia et Jain, 2003). D'autres types d'Eudragit (*i.e.* Eudragit® E PO), présentant des groupements fonctionnels cationiques de type diméthyl aminoéthyle, sont solubles dans un milieu gastrique et insolubles dans un milieu entérique.

Le pH gastro-intestinal peut varier pour le même individu ou d'un individu à l'autre, ce qui peut affecter l'efficacité de ces systèmes. Chez les personnes en bonne santé, il y a une augmentation de pH du duodénum ($\text{pH } 6.6 \pm 0.5$) vers iléum distal ($\text{pH } 7.5 \pm 0.4$), suivi par une diminution de pH au niveau du cecum ($\text{pH } 6.4 \pm 0.4$) et, finalement, par une augmentation lente de pH du côlon droit vers le côlon gauche avec un pH final de 7.0 ± 0.7 (Evans *et al.*, 1988). La similarité de pH entre le petit et le gros intestin fait les systèmes à libération dépendante de pH moins performants au niveau du côlon. En plus, dans des cas pathologiques (*i.e.* colite ulcéreuse), le pH du côlon est plus bas que dans les situations normales, non-pathologiques (Leopold et Eikeler, 2000). Malgré toutes ces limitations, des systèmes de libération dépendants de pH sont disponibles commercialement pour le traitement des différentes maladies, comme la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn, *i.e.* Asacol®, Entocort® (Friend, 2005).

D'autres formulations, tel que des formulations à double-noyaux, peuvent aussi être considérées pour la livraison des principes actifs au niveau du côlon. Ces dernières contiennent déjà à l'intérieur un noyau comprimé avec l'agent actif; ce comprimé est recouvert par un excipient sensible au pH et/ou érodable, et le comprimé final est obtenu par une deuxième compression (Ritschel *et al.*, 1990).

2.2.1.2 Systèmes à libération dépendante de temps

Les systèmes dépendants de temps ("chrono-delivery") libèrent le principe actif après un certain temps de latence qui est pré-programmé et qui correspond, en général, au temps nécessaire du système pour arriver au niveau du site intestinal ciblé (Hebden *et al.*, 1999). Ainsi, chez l'homme, une période de latence d'approximativement 5 heures est considérée suffisante pour atteindre le côlon, en tenant compte que le temps de transit du petit intestin est de 3-5 heures (Chourasia et Jain, 2003).

PulsincapTM a été un des premiers systèmes qui utilise ce principe pour la livraison des médicaments au niveau du côlon. Ce système est représenté par une capsule imperméable remplie avec le médicament, dont la sortie est obturée par un bouchon qui, en contact avec les fluides gastro-intestinaux, s'hydrate et se gonfle, en étant éjecté de la capsule après une certaine période de latence, ce qui permet la libération du médicament (Figure 2.3b). La période de latence peut être contrôlée par les dimensions et la composition du bouchon (*i.e.* polyméthacrylates, hydroxypropylméthyl cellulose). Afin de réduire l'influence du temps de résidence gastrique sur la performance du PulsincapTM, le système a été modifié par l'application d'une couche entérique. Le concept de *double barrière* se trouve fréquemment à la base de cette technologie. Ainsi, les systèmes peuvent être couverts par une couche entérique qui se dissout dans le petit intestin pour révéler ensuite une barrière polymérique intérieure qui retarde la libération du principe actif par des mécanismes de gonflement, d'érosion ou de dissolution (Basit et Bloor, 2003).

Ces systèmes présentent leurs limitations à cause des différences dans le temps de transit qui peut varier d'un individu à l'autre et des différences de transit existantes entre le rythme diurne et celui nocturne. La performance des systèmes à libération contrôlée par le temps peut aussi être affectée de façon significative dans les conditions pathophysiologiques. Ainsi, une accélération du temps de transit pour différents régions de l'intestin a été observé chez les patients avec le syndrome d'intestin irritable (Vassallo *et al.*, 1992) ou avec la colite ulcéreuse (Reddy *et al.*, 1991).

2.2.1.3 Systèmes à libération dépendante de pression

La pression, générée par les contractions musculaires des parois intestinales pour propulser le contenu intestinal, varie en intensité et en durée au long du tractus gastro-intestinal, la pression au niveau du côlon étant considérée plus élevée que dans l'estomac ou le petit intestin. Ainsi, des systèmes ont été développés (Figure 2.3c) pour résister à la pression durant la première partie du tube digestif et de se défaire à la pression plus élevée du côlon (Muraoka *et al.*, 1998; Shibata *et al.*, 2001). En général, des capsules recouvertes avec éthyl cellulose sont utilisées pour ce but. Le système peut être modifié pour résister ou se défaire à différentes pressions en modifiant la taille de la capsule et la grosseur des enrobages rupturables. Ce type de système présente des limitations et peut se désintégrer même au niveau de l'estomac, à cause des contractions existants à ce niveau-ci, qui peuvent être assez fortes, surtout si la nourriture a été administrée en même temps (Basit et Bloor, 2003).

2.2.1.4 Systèmes à libération dépendante de la présence de la microflore intestinale

La présence des bactéries au niveau du côlon peut jouer un rôle important dans le processus de libération ciblé des différents agents actifs. Ainsi, les enzymes bactériennes sont capables de métaboliser différents substrats (*i.e.* polysaccharides) qui

ne sont pas digérés dans la partie supérieure du tube digestif. Ces matériaux peuvent donc être utilisés comme transporteurs pour assurer la livraison des médicaments au niveau du côlon (Figure 2.3d). Le côlon a une population de bactéries de $10^{11} - 10^{12}$ unités formatrices de colonies/mL (Gorbach, 1971) qui produisent une variété d'enzymes, comme β -glucosidase, β -galactosidase, β -xylosidase, β -arabinofuranosidase, nitro-réductase, azo-réductase, etc. (Englyst, Hay et MacFarlane, 1987; Kinget *et al.*, 1998). Ces enzymes bactériennes sont responsables de la dégradation de plusieurs substrats. Grâce à la présence d'un nombre élevé de bactéries au niveau du côlon, cette stratégie de libération des principes actifs est plus spécifique pour ce segment du tube digestif.

Ce principe a été exploité pour le développement des azo-dérivés, avec le but d'obtenir un système universel pour la livraison ciblée au niveau du côlon (Sinha et Kumria, 2003). Le métabolisme des azo-dérivés est un des processus métaboliques le plus étudié. Ainsi, le lien de type *azo* entre une molécule active et un transporteur peut être éliminé en présence des azo-réductases produites par les bactéries du côlon (Chan *et al.*, 1983). Différents azo-polymères ont été aussi évalués comme des matériaux d'enrobage, en protégeant les agents actifs contre les milieux dénaturants de l'estomac (pH acide, pepsine) et du petit intestin (enzymes digestives: *alpha*-amylase, lipase, trypsine, chymotrypsine), avec leur libération dans le côlon (Saffran *et al.*, 1988). D'autres liens susceptibles à l'hydrolyse en présence des enzymes bactériennes ont été aussi visés. Ainsi, des acides aminés ont été utilisés comme transporteurs de médicaments pour la livraison ciblée au niveau du côlon, le médicament étant attaché aux groupes $-NH_2$ ou $-COOH$ de ces acides aminés (Nakamura *et al.*, 1992). L'administration des antibiotiques peut détruire partiellement ou totalement la microflore intestinale, ce qui peut influencer la performance de ces systèmes.

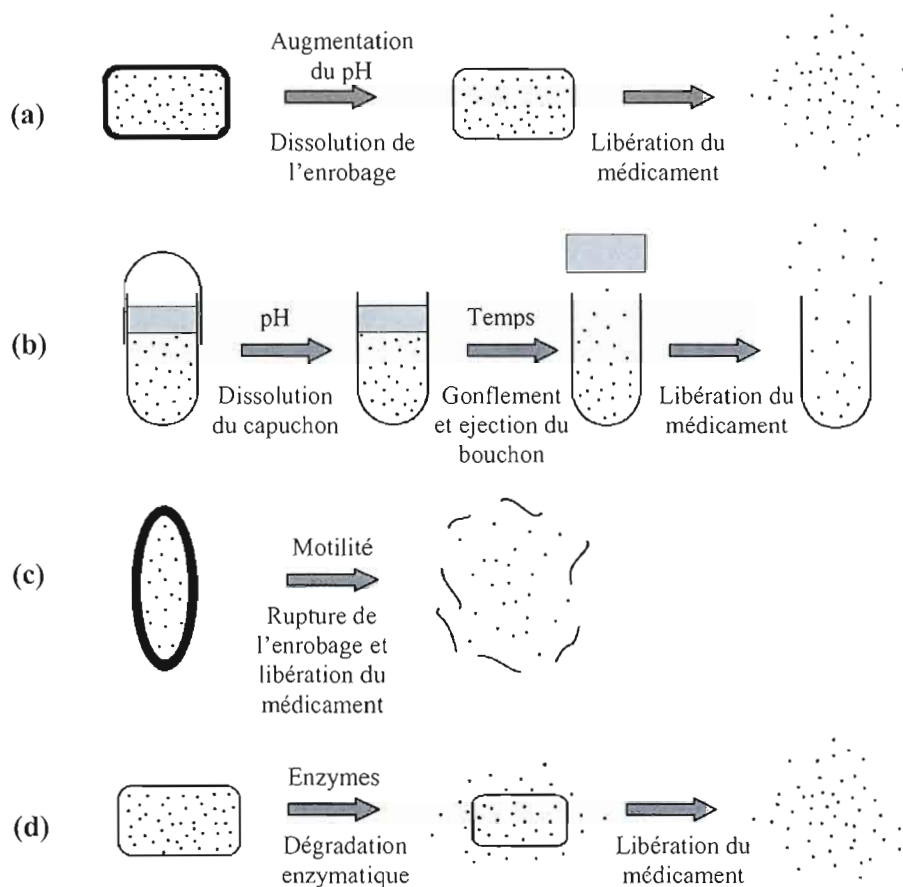


Figure 2.3: Représentation schématique des différents types de systèmes de relargage ciblé. Système à libération dépendante de pH (a), de temps (b), de pression (c) et de la présence de la microflore intestinale (d).

Plusieurs mécanismes de livraison d'un agent actif peuvent être présents dans un système de transport intestinal. Ainsi, récemment, un nouveau système osmotique a été développé par Liu et ses collaborateurs (Liu *et al.*, 2007). Le système exploite les avantages de l'enrobage avec un polymère sensible au pH et ceux de l'utilisation des polysaccharides biodégradables au niveau du côlon. Le principe actif, associé au chitosane et à un acide organique, se trouve à l'intérieur du système osmotique, qui est couvert par deux membranes: une membrane semi-perméable d'acétate de cellulose et

chitosane, située à la proximité du principe actif, et une membrane entérique (Eudragit® L100-55), qui couvre le système. Grâce à sa membrane entérique, le système reste intact dans l'estomac. Cette membrane se dissout au niveau du petit intestin, ce qui permet au fluide intestinal d'entrer à l'intérieur du système. L'environnement aqueux acide obtenu à l'intérieur du système par la dissolution de l'acide organique détermine le gonflement du chitosane et la formation d'un gel qui contient le principe actif dispersé. À l'arrivée du système au niveau du côlon, la membrane semi-perméable (à base d'acétate de cellulose et chitosane), située à la proximité du gel formé, est dégradée par la microflore intestinale avec la formation des micropores (Figure 2.4). Ceci permet la libération constante du principe actif sur une période de jusqu'à 24 heures au niveau du côlon (Liu *et al.*, 2007).

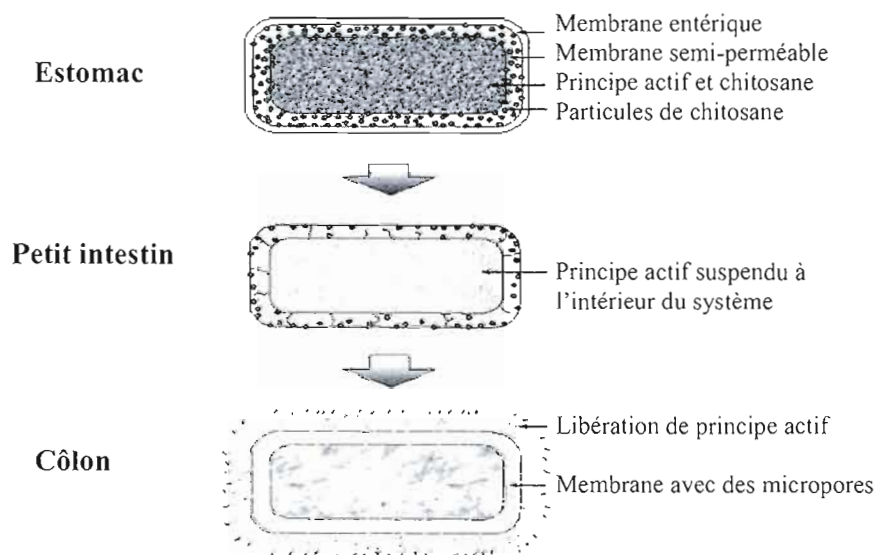


Figure 2.4: Représentation schématique d'un système osmotique avec libération dépendante de la microflore du côlon (*d'après Liu et al.*, 2007).

2.2.2 Polymères utilisés comme systèmes de transport pour la libération des principes actifs au niveau de l'intestin

Plusieurs polymères naturels et synthétiques ont été évalués pour le transport et la livraison orale des principes actifs au niveau de l'intestin. L'utilisation des polymères synthétiques dans les formulations pharmaceutiques est plus facile à cause de la possibilité d'adapter leurs caractéristiques au but visé. Ainsi, les polymères synthétiques, comme le polyéthylène glycol, l'acide poly(DL-lactique) et d'autres, sont très répandus. Le polyvinyle alcool, la poly *N*-vinyle pyrrolidone et le polyéthylène glycol sont des polymères qui contrôlent la pénétration du milieu de dissolution à l'intérieur de la matrice et leur gonflement contrôle la libération du principe actif (Korsmeyer *et al.*, 1983). Toutefois, les polymères naturels sont plus utilisés grâce à leurs caractéristiques de biocompatibilité et biodégradabilité. L'immunogénicité faible de certains de ces polymères présente aussi une importance majeure pour leur usage. Ainsi, les formulations qui ont à la base des polysaccharides provenant des sources végétales (amidon, pectine, cellulose, inuline), animales (chitosane, le sulfate de chondroïtine), des algues (alginate) ou des micro-organismes (dextrane) sont largement utilisées pour la libération contrôlée ou retardée des principes actifs administrés par la voie orale (Sinha et Kumria, 2003).

Parmi les polysaccharides existants, l'amidon modifié est assez utilisé comme matériel polymérique dans les systèmes de libération des principes actifs. La vitesse de dégradation des systèmes à base de ce polymère modifié et la vitesse de libération de l'agent actif peuvent être contrôlées par son degré de modification (Laakso, Arturson et Sjöholm, 1986). Les capsules enrobées d'amidon peuvent aussi être utilisées pour la livraison des principes actifs au niveau du côlon (Vilivalam, Illum et Iqbal, 2000). L'amylose présente la capacité de former des films par gélification, et la structure de ce microfilm est résistante à l'action de α -amylase pancréatique, mais susceptible à la digestion par les amylases de la microflore du côlon (Chourasia et Jain, 2003).

Les hydrogels de chitosane ont été largement utilisés pour la libération contrôlée des médicaments (Risbud *et al.*, 2000). Pour la livraison ciblée des principes actifs au niveau du côlon, le chitosane a été évalué sous forme de capsules enrobées (Tozaki *et al.*, 1999), matrices (Zambito et Colo, 2003), hydrogels (Zhang et Neau, 2002) et microsphères (Lorenzo-Lamosa *et al.*, 1998). Une digestion limitée du chitosane par les enzymes bactériennes intestinales (*i.e.* β -glucosidase) peut avoir lieu (Okamoto *et al.*, 2001; Tozaki *et al.*, 1997; Zhang et Neau, 2002). Des systèmes de type polyélectrolyte peuvent être développés pour la livraison des protéines (Chen *et al.*, 2004) ou d'autres agents actifs au niveau des sites intestinaux spécifiques.

D'autres polysaccharides, comme le sulfate de chondroïtine (unités d'acide D-glucuronique et de sulfate de *N*-acétyl-D-galactosamine liées par des liaisons β -1,3), l'inuline (unités de D-fructose liées par des liaisons β -2,1) ou le dextrane (unités de D-glucose liées par des liaisons α -1,6) ont été utilisés sous différentes formes (capsules, comprimés, hydrogels) pour l'administration des actifs au niveau de l'intestin (Brondsted, Andersen et Hovgaard, 1998; Chiu *et al.*, 1999; Rubinstein, Nakar et Sintov, 1992; Vervoort *et al.*, 1997). Certains polysaccharides présentent une solubilité élevée dans un milieu aqueux, et une solution idéale à ce problème est de modifier la solubilité des polysaccharides, tout en retenant leur biodégradabilité. Ainsi, pour réduire la solubilité de certains de ces polysaccharides utilisés comme systèmes de transport, des réticulations ont été réalisées en gardant ainsi leur intégrité dans le milieu physiologique de l'intestin (Rubinstein, Nakar et Sintov, 1992; Rubinstein *et al.*, 1993) et présentant une susceptibilité à l'attaque enzymatique inversement proportionnelle avec le degré de modification (Gliko-Kabir *et al.*, 2000). Des mélanges des polysaccharides solubles (pectine) et insolubles (éthyl cellulose) peuvent se trouver à la base de certains enrobages (Wakerly *et al.*, 1996). Des systèmes de libération des agents actifs au niveau de l'intestin couverts avec des films basés sur une combinaison de plusieurs polysaccharides, comme la pectine, le chitosane et le hydroxypropylméthyl cellulose (3 : 1 : 1) ont été aussi rapportés (Macleod *et al.*, 1999).

CHAPITRE III

AGENTS BIOACTIFS ADMINISTRABLES PAR LA VOIE ORALE

3.1 Vaccins

3.1.1 Généralités – vaccins pour la prévention des maladies entériques

En général, les traitements contre les pathologies entériques sont basés sur des antibiotiques, mais, à cause du risque du développement d'une résistance bactérienne à long terme, ainsi qu'aux effets négatifs des antibiotiques sur la flore intestinale, l'usage des antibiotiques est moins désiré. En effet, l'équilibre de la flore intestinale semble jouer un rôle très important dans la tolérance orale. Une des alternatives pour prévenir les infections intestinales est la vaccination orale, avec l'induction d'une immunité systémique et d'une immunité au niveau de la muqueuse intestinale. Ainsi, pour prévenir une infection, il faut avoir une forte immunité au niveau de la muqueuse intestinale qui représente la porte d'entrée de l'agent pathogène dans l'organisme. La caractéristique majeure de l'immunité au niveau des muqueuses est représentée par la sécrétion d'immunoglobulines IgA qui influencent le processus d'adhérence des agents pathogènes à la muqueuse intestinale et favorisent leur élimination par la formation des complexes immuns (McGhee *et al.*, 1992). Un vaccin administré par la voie parentérale ne peut pas induire une réponse immune mucoale (Bianchi *et al.*, 1996). La façon de présentation de l'antigène, le type d'antigène et la dose administrée semblent d'être essentiels. Ainsi, la présentation de l'antigène par la voie parentérale ou mucoale implique différents types de cellules présentatrices d'antigène. Ceci va induire la production de cytokines différentes qui vont promouvoir des fonctions

différentes des lymphocytes T, en ayant comme résultat final la suppression *versus* la stimulation de la production de IgA.

L'administration des vaccins par la voie orale présente plusieurs avantages:

- facilité d'administration (la voie orale est considérée comme étant non-invasive),
- certaines exigences de l'administration parentérale (*i.e.* conditions stériles de fabrication du vaccin et le besoin de personnel infirmier) ne sont pas nécessaires pour l'administration orale,
- stimulation d'une réponse immunitaire locale au niveau de la muqueuse intestinale et
- protection au niveau du site de pénétration de l'agent pathogène dans l'organisme.

Un vaccin d'origine bactérienne administré par la voie orale peut être représenté par des antigènes purifiés et/ou des cellules bactériennes inactives (vaccin non-vivant) ou par une souche bactérienne atténuée ou non-pathogène (vaccin vivant).

3.1.2 La diarrhée post-sevrage chez le porc

3.1.2.1 Les agents pathogènes responsables d'infections intestinales

Pour la majorité des infections intestinales avec *Escherichia coli* (*E. coli*), une des espèces pathogènes responsables de l'induction des diarrhées, l'adhésion des bactéries aux sites intestinaux joue un rôle important dans la pathogenèse (qui est liée principalement à la sécrétion de deux types de toxines, une toxine thermolabile, LT, et une toxine thermostable, ST). Ainsi, l'adhésion de ces bactéries se fait au niveau des récepteurs spécifiques qui se trouvent à la surface de la muqueuse intestinale et peut être réalisée par intermédiaire des *fimbriae*, des structures protéiques qui se trouvent à la surface des bactéries (Duguid, Smith et Edmunds, 1955). Les espèces pathogènes d'*E. coli* sont classifiées sur la base de leurs propriétés pathogènes en:

- *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC - agent responsable de la diarrhée chez toutes les espèces animales),
- *E. coli* entéropathogènes (EPEC - agent responsable de la diarrhée chez les humains, les porcs, les lapins, les chiens, les chats),

- *E. coli* entéroinvasives (EIEC - agent pathogène chez les humains),
- *E. coli* vérotoxino-gènes (VTEC - agent pathogène chez les porcs, les chiens, les chats),
- *E. coli* entérohémorragiques (EHEC - agent pathogène chez les humains et les bovins).

Les souches entérotoxino-gènes d'*E. coli* (ETEC) sont la principale cause de diarrhée chez les porcelets nouveau-nés, mais aussi chez les porcelets plus âgés, qu'ils soient sevrés ou non. Grâce à la présence des *fimbriae*, les ETEC peuvent coloniser les tissus intestinaux et sécréter des entérotoxines qui modifient la perméabilité de l'épithélium et dérèglent le transport des électrolytes au niveau des entérocytes, ce qui peut engendrer une diarrhée aqueuse. Les porcelets qui ne possèdent pas les récepteurs spécifiques pour les *fimbriae* sont résistants aux infections avec ETEC (Rutter *et al.*, 1975). Les bactéries EPEC adhèrent aussi à la muqueuse intestinale et détruisent la bordure en brosse de la couche épithéliale. Les EIEC, VTEC et EHEC ont la capacité de pénétrer et de se multiplier à l'intérieur de la muqueuse intestinale, déclenchant une réponse inflammatoire et la destruction des cellules épithéliales (Nataro et Kaper, 1998).

Les *fimbriae* F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P) et F41 représentent des facteurs pathologiques importants dans le processus qui engendre la diarrhée néonatale chez le porc. En général, les bactéries ETEC qui possèdent les *fimbriae* F4 (ETEC F4⁺) et les *fimbriae* F18 (ETEC F18⁺) sont à l'origine de la diarrhée post-sevrage chez le porc (Fairbrother et Gyles, 2006). D'habitude, les infections avec ETEC F4⁺ se produisent durant la première semaine après le sevrage, tandis que les infections avec ETEC F18⁺ se rencontrent entre la première et la deuxième semaine post-sevrage (Fairbrother et Gyles, 2006).

3.1.2.2 La toxicogénèse des bactéries d'*Escherichia coli*

La capacité de toxicogénèse des ETEC est exprimée par la sécrétion de deux types d'entérotoxines: la toxine thermo-labile (LT) et la toxine thermo-stable (ST), qui contribuent, par leurs mécanismes d'action, à la diminution de l'absorption des électrolytes et des fluides du tractus intestinal. L'entérotoxine LT, avec deux sérotypes principaux, LT-I et LT-II, est une protéine de masse moléculaire élevée, fortement immunogène, tandis que l'autre type d'entérotoxine, ST, à cause de sa petite taille, ne présente pas un caractère immunogène (Nataro et Kaper, 1998). La toxine LT-I est formée d'une sous-unité A de 28 kDa, responsable des activités enzymatiques de la toxine, et de cinq sous-unités B identiques de 11,5 kDa (Streatfield *et al.*, 1992). Les toxines ST (STa et STb) sont des petits monomères: le STa est un peptide de 18–19 acides aminés, avec une masse moléculaire de 2 kDa, et le STb contient 48 acides aminés et a une masse moléculaire de 5,1 kDa (Arriaga, Harville et Dreyfus, 1995; Dubreuil, 1997).

Les mécanismes d'action des toxines sécrétées par les bactéries ETEC sont représentés schématiquement dans la Figure 3.1. Ainsi, les bactéries ETEC adhèrent aux entérocytes et secrètent la toxine LT-I qui est ensuite internalisée par les cellules intestinales. La sous-unité A du LT-I a une activité enzymatique d'ADP-ribosyltransferase, liant le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et transférant le groupement ADP-ribose du NAD vers une protéine qui lie le guanosine triphosphate (GTP) et qui contrôle l'activité de l'adenylate cyclase (Nataro et Kaper, 1998). Ensuite, il y a une augmentation intracellulaire d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) qui induit la stimulation de la kinase A et conduit à la phosphorylation des transporteurs des ions chlorure, situés au niveau de la membrane apicale, et à l'hypersécrétion des ions chlorure (Figure 3.1a). La toxine STa se lie à son récepteur et stimule la guanylate cyclase, en conduisant à des concentrations intracellulaires élevées de guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Par la suite, ces niveaux élevés de GMPc stimulent la kinase G, ceci ayant comme résultat une augmentation de la

sécrétion des ions chlorure et une diminution de l'absorption de la chlorure de sodium (Figure 3.1b).

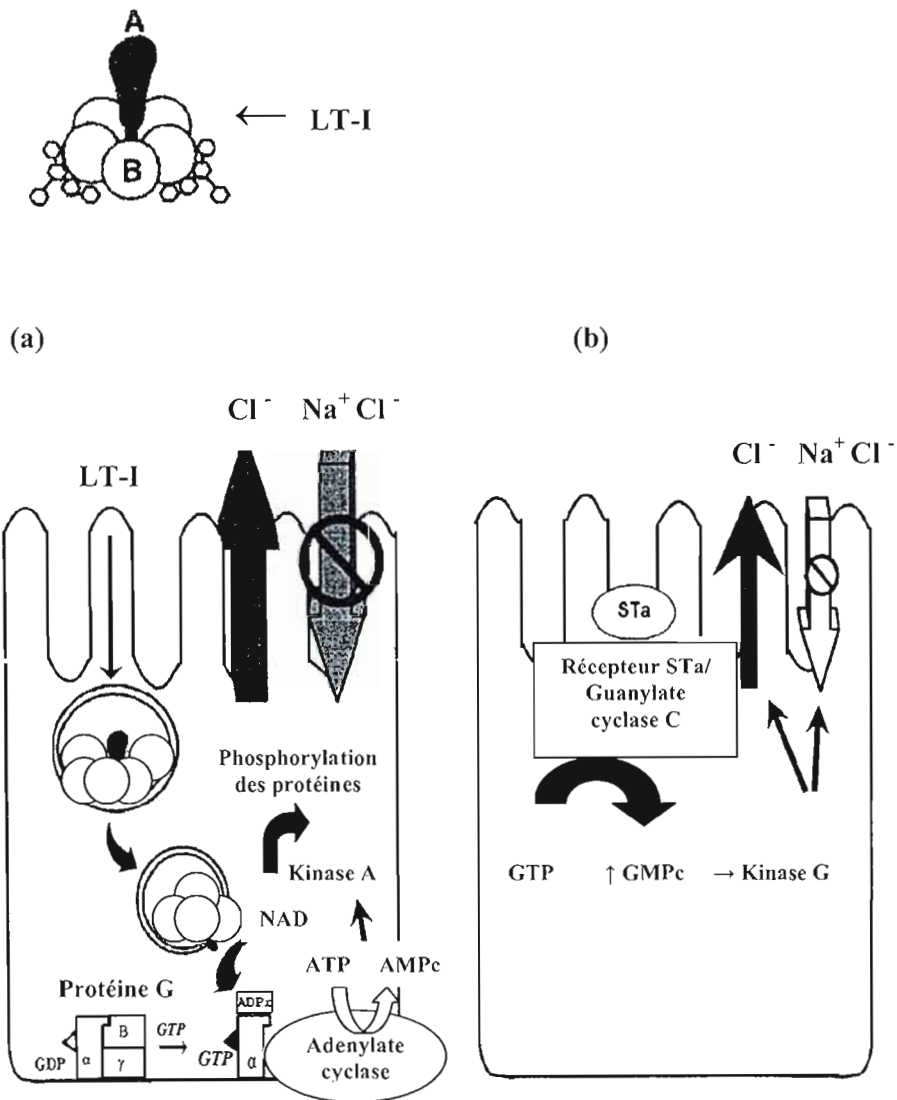


Figure 3.1: La structure de LT-I et les mécanismes d'action des toxines sécrétées par les bactéries ETEC

(a) Mécanisme d'action de la toxine LT-I, **(b)** Mécanisme d'action de la toxine STa (*d'après Nataro et Kaper, 1998*).

3.1.3 Vaccins sous-unitaires à base des *fimbriae* F4 contre la diarrhée post-sevrage chez le porc

La vaccination parentérale du porc durant la grossesse avec des vaccins à base de *fimbriae* F4 a comme résultat une sécrétion des anticorps spécifiques pour les *fimbriae* F4 dans colostrum et lait. Ainsi, durant la période d'allaitement, ces anticorps sécrétés protègent les porcelets contre les infections avec ETEC F4⁺ (Rutter et Jones, 1973; Deprez *et al.*, 1986). Toutefois, après sevrage, les porcelets ne bénéficient plus de cette protection passive et ils deviennent susceptibles aux infections avec ETEC (Hampson, 1994). À ce stade-ci, la présence d'une immunité mucosale est importante pour assurer une bonne protection contre les infections avec ETEC. La capacité des *fimbriae* purifiées d'activer le système immunitaire muqueux présente une importance majeure pour le développement des vaccins oraux contre les infections avec ETEC F4⁺ (Fairbrother, Nadeau et Gyles, 2005). Les *fimbriae* sont des agents immunogènes puissants tant sous forme de vaccins sous-unitaires que sous forme de vaccins bactériens. Les vaccins à base des *fimbriae* ont déjà été utilisés avec succès pour la protection des animaux contre les bactéries ETEC qui provoquent la diarrhée (Moon et Bunn, 1993).

3.1.3.1 La morphologie des *fimbriae* F4

Les *fimbriae* sont des structures filamenteuses de nature protéique, avec une longueur de 0,5–1,5 µm, disposées autour de la bactérie (Klemm, 1985). Deux différents groupes morphologiques de filaments présents sur la surface des bactéries *E. coli* ont été identifiés: les *pili* et les *fimbriae*. Les *pili* sont des structures rigides avec un diamètre de 7-8 nm, tandis que les *fimbriae* sont plutôt minces et flexibles avec un diamètre de 1-4 nm. Ainsi, les *fimbriae* F1 et F6 ont une structure de *pili*, tandis que les *fimbriae* F4 et F5 ont une structure de *fimbriae*. Souvent, l'un ou l'autre terme est utilisé pour les mêmes structures.

3.1.3.2 La structure des *fimbriae* F4

Plusieurs sous-unités ont été identifiées dans la structure des *fimbriae* F4: une sous-unité principale (FaeG) et plusieurs sous-unités secondaires (FaeC, FaeF, FaeH, FaeI, FaeJ). Chaque filament de *fimbriae* est représenté par des centaines de sous-unités protéiques principales FaeG identiques, et chaque sous-unité FaeG a une masse moléculaire de 27540 Da (Gaastra *et al.*, 1981). Cette unité principale joue un rôle important dans le processus d'adhésion des *fimbriae* au niveau des récepteurs intestinaux (Jacobs *et al.*, 1987). Bakker et ses collaborateurs (1992a) ont décrit le site d'adhésion du FaeG aux récepteurs comme un arrangement spatial de deux acides aminés avec des chaînes latérales hydrophobes (phénylalanine ou leucine aux positions 134 et 147), avec un ou plusieurs acides aminés qui possèdent des chaînes latérales hydrophiliques (aux positions 136, 155 et 216 ou dans la région variable 163-174). La capacité des *fimbriae* d'adhérer aux récepteurs spécifiques est une condition pour leur immunogénicité suite à l'administration orale. Au bout des *fimbriae* se trouve la sous-unité FaeC, avec une masse moléculaire de 16900 Da (Oudega *et al.*, 1989), ce qui suggère que cette protéine puisse être impliquée dans le processus d'initiation de la formation des *fimbriae*. Les sous-unités protéiques FaeF (15200 Da) et FaeH (25500 Da) sont impliquées probablement dans le processus d'élongation des *fimbriae* (Bakker *et al.*, 1992b). Les fonctions des sous-unités FaeI (24800 Da) et FaeJ (25100 Da) sont peu connues.

Quelques types sérologiques de *fimbriae* F4 ont été identifiés chez les souches d'*E. coli* qui infectent les porcelets post-sevrés: F4ab (264 acides aminés), F4ac (262 acides aminés) et F4ad (264 acides aminés). La comparaison de ces trois structures primaires (F4ab, F4ac, F4ad) de la sous-unité principale FaeG a mis en évidence que les premiers 37 et les derniers 28 résidus d'acides aminés et ceux situés entre les positions 105 et 132 sont identiques. Ces séquences conservées pourraient être impliquées dans l'assemblage et le maintien de la structure des *fimbriae* (Mooi et de Graaf, 1985).

3.1.3.3 Le rôle des *fimbriae* F4 dans l'induction d'une réponse immunitaire

L'administration des *fimbriae* F4 purifiées par la voie orale peut induire une réponse immunitaire au niveau de la muqueuse intestinale chez le porc et la présence des récepteurs spécifiques pour les *fimbriae* est une condition essentielle (Van den Broeck, Cox et Goddeeris, 1999a,b; Van den Broeck *et al.*, 2000).

Les *fimbriae* F4ab reconnaissent des récepteurs spécifiques représentés par les glycoprotéines de 25, 35, 40-42 et 60 kDa situées au niveau du mucus intestinal et les glycoprotéines de 16, 40-70, 74, 210 et 240 kDa qui se trouvent au niveau de la bordure en brosse (Billey, Erickson et Francis, 1998; Erickson *et al.*, 1992; Grange et Mouricout, 1996; Metcalfe *et al.*, 1991; Willemsen et de Graaf, 1992). D'autres récepteurs sont représentés par les glycoprotéines de 25, 35 et 60 kDa (situées au niveau du mucus intestinal) et celles de 40-70, 210 et 240 kDa (situées au niveau de la bordure en brosse) qui sont reconnues par les *fimbriae* F4ac, tandis que les *fimbriae* F4ad reconnaissent les glycoprotéines de 45-70 kDa situées au niveau des membranes de la bordure en brosse du petit intestine (Billey, Erickson et Francis, 1998; Erickson *et al.*, 1992; Willemsen et de Graaf, 1992).

Après avoir administré le vaccin sous-unitaire à base des *fimbriae* F4, les *fimbriae* F4 adhèrent aux récepteurs spécifiques et stimulent le système immunitaire muqueux et systémique (De Aizpurua et Russell-Jones, 1988; Fairbrother, Nadeau et Gyles, 2005). Des anticorps spécifiques anti-F4 (IgA et IgG) sont ensuite sécrétés au niveau des plaques du Peyer et des nodules lymphoïdes mésentériques, ce qui indique la stimulation du système immunitaire mucosal (Van den Broeck, Cox et Goddeeris, 1999a). La caractéristique majeure de l'immunité au niveau des muqueuses est représentée par la sécrétion d'immunoglobulines IgA. Ces anticorps migrent vers les entérocytes et agissent comme une barrière protectrice pour les agents pathogènes bactériens qui portent les *fimbriae* F4 (ETEC F4⁺), en influençant le processus

d'adhérence des agents pathogènes à la muqueuse intestinale et en favorisent leur élimination par la formation des complexes immuns (McGhee *et al.*, 1992). L'importance des complexes immuns dépend des concentrations relatives d'anticorps et d'antigène. Lorsque l'anticorps est en grand excès, il y a la fixation de molécules d'anticorps séparées à chaque déterminant antigénique. Ainsi, les anticorps forment des ponts entre les antigènes, et le résultat est la formation d'un agrégat d'anticorps et d'antigènes appelé complexe immun. Quand l'antigène est présent en excès, deux antigènes différents se fixent à chaque anticorps et le développement de l'agrégat est ainsi inhibé. Ainsi, l'immunisation orale des porcelets sevrés avec le vaccin sous-unitaire à base de *fimbriae* F4 les protège contre les infections ultérieures avec ETEC F4⁺, en bloquant l'adhésion des bactéries pathogènes aux récepteurs spécifiques (Van den Broeck, Cox et Goddeeris, 1999a).

3.1.4 Vaccins bactériens à base d'*Escherichia coli* (F4⁺) contre la diarrhée post-sevrage chez le porc

L'administration des vaccins oraux à base d'*E. coli* non-pathogène (F4⁺, LT⁻, ST⁻) a l'objectif d'obtenir une réaction immunitaire assez importante au niveau de la muqueuse intestinale pour empêcher la prolifération des pathogènes de type ETEC F4⁺. La vaccination parentérale avec un vaccin bactérien à base d'*E. coli* (F4⁺) n'est pas efficace pour assurer cette immunité chez les porcelets post-sevrés, car le vaccin parentéral ne stimule pas la production de IgA au niveau de la muqueuse intestinale (Bianchi *et al.*, 1996). Une fois administré par la voie orale, le vaccin bactérien atteint les sites intestinaux où il y a des récepteurs qui reconnaissent le type de *fimbriae* situées à l'extérieur des bactéries. En fonction de chaque type de *fimbriae*, il y a une certaine distribution des récepteurs spécifiques au niveau intestinal chez le porc. Ainsi, les bactéries *E. coli* (F4⁺) adhèrent en quantité plus grande à la région jéjunale qu'à la région duodénale du petit intestin (Cox et Houvenaghel, 1993). Différemment, les souches d'*E. coli* présentant des *fimbriae* F5 (ETEC F5⁺) adhèrent surtout au niveau

caudal du petit intestin. L'adhésion des bactéries constituant le vaccin aux récepteurs spécifiques leur permet de coloniser le petit intestin et empêche leur enlèvement par le péristaltisme intestinal.

3.2 Probiotiques

L'idée que la microflore bactérienne joue un rôle important pour la santé est de plus en plus répandue. Plusieurs concepts sur «l'équilibre de la flore» sont apparus sur certains produits alimentaires qui peuvent influencer la microflore de deux façons: premièrement, en apportant des micro-organismes vivants, considérés comme bénéfiques (probiotiques) et, deuxièmement, en fournissant des substrats non-digestibles (prébiotiques) qui atteignent l'intestin et y nourrissent de façon spécifique certaines bactéries considérées comme bénéfiques.

3.2.1 Probiotiques – bactéries bénéfiques pour la santé

Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets bénéfiques sur la santé, allant au-delà des effets nutritionnels traditionnels (Guarner et Schaafsma, 1998). Le terme «probiotique» provient du grec «pour la vie».

Les probiotiques peuvent être consommés soit comme un aliment, soit comme une préparation non-alimentaire. Un probiotique doit présenter plusieurs qualités pour avoir une bonne efficacité:

- avoir un effet bénéfique sur l'organisme,
- être non-pathogène et non-toxique,
- présenter des effets antagonistes envers les pathogènes et résister à leurs effets,
- être capable d'avoir une certaine résistance au niveau du tube digestif, d'arriver en nombre suffisant au niveau de l'intestin et de coloniser les surfaces des muqueuses,
- contenir un nombre élevé des cellules vivantes,
- avoir une bonne stabilité durant l'entreposage.

Les concentrations de probiotiques parvenant vivants dans l'intestin sont influencées par les quantités ingérées et par le pourcentage de survie. Certains probiotiques sont détruits dès leur passage dans l'estomac, alors que d'autres traversent l'estomac, l'intestin grêle et parfois le côlon à hautes concentrations. La capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale est un des critères importants à la colonisation et à la croissance des bactéries, en résistant ainsi au péristaltisme intestinal (Moussavi et Adams, 2010).

3.2.2 Prébiotiques

Les prébiotiques sont définis comme des ingrédients alimentaires non-digestibles qui influencent de façon bénéfique l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'un nombre limité de groupes de bactéries dans l'intestin, avec des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte (Collins et Gibson, 1999). L'effet le plus connu des prébiotiques est l'augmentation sélective de la concentration de certaines bactéries considérées comme bénéfiques en défaveur d'autres bactéries pathogènes tel que *Clostridium sp.* Ainsi, l'administration des prébiotiques pourrait modifier de façon transitoire le profil bactérien intestinal. La plupart des prébiotiques sont des glucides d'origine végétale, mais d'autres sont d'origine animale ou microbienne. Les prébiotiques les plus connus sont représentés par les fructanes (polymères de fructose) parmi lesquels on trouve l'inuline et ses dérivés présents dans plusieurs végétaux, et les fructo-oligosaccharides, produits par l'hydrolyse de l'inuline. D'autres prébiotiques fréquemment utilisés sont les galacto-oligosaccharides, les maltodextrines, le lactulose (Collins et Gibson, 1999).

3.2.3 Synbiotiques

Les synbiotiques sont des préparations contenant des probiotiques et des prébiotiques (Collins et Gibson, 1999). Bomba et ses collaborateurs (2002) ont montré

que le synbiotique basé sur la combinaison du *Lactobacillus paracasei* (*L. paracasei*) avec maltodextrine a conduit à une diminution de colonisation intestinale avec *E. coli*. L'administration des bactéries lactiques *L. paracasei* associées avec des fructo-oligosaccharides peut contribuer à la diminution des espèces de *Clostridium* et *Enterobacterium* (Bomba *et al.*, 2002). Comme la microflore intestinale est différente d'une personne à l'autre, l'efficacité des synbiotiques peut aussi être différente.

3.2.4 La microflore intestinale

Plus de 500 espèces de bactéries en perpétuelle concurrence sont réparties le long du tract gastro-intestinal. Au niveau de l'estomac et dans la partie proximale du petit intestin, la sécrétion d'acide chlorhydrique et des acides biliaires n'offre pas les conditions optimales pour la colonisation des bactéries. Toutefois, le nombre des bactéries augmente de façon significative dans la partie distale du petit intestin pour arriver à $10^{11} - 10^{12}$ unités formatrices de colonies/mL au niveau du côlon (Gorbach, 1971). Chez le fœtus, l'intestin est stérile, en étant en contact seulement avec le fluide amniotique. Ensuite, chez le nouveau-né, la colonisation de l'intestin est réalisée au fur et à mesure par son interaction avec l'environnement. La microflore change en composition avec l'âge d'une personne, avec une réduction en *Bifidobacter sp.* (*B. sp.*) et une augmentation de la diversité des espèces de *Bacteroides* chez les personnes plus âgées comparativement avec les personnes plus jeunes et les enfants (Hopkins, Sharp et Macfarlane, 2002). Ces modifications de la microflore bactérienne peuvent affecter la résistance à la colonisation par des pathogènes comme *Clostridium difficile*. La variété de la microflore est aussi directement influencée par le régime alimentaire et le type de médication (*i.e.* administration des antibiotiques). Cet écosystème microbien complexe est individuel et typique pour chaque personne. L'activité des bactéries commensales implique diverses réactions enzymatiques qui agissent sur le métabolisme et la physiologie de l'hôte. Ainsi, les fonctions des bactéries peuvent être nutritionnelles et/ou immunitaires. L'équilibre entre toutes les composantes est

essentiel pour assurer la protection du système digestif. Une alimentation déséquilibrée, le stress, les répercussions des maladies diverses ou certains traitements (l'usage des antibiotiques, la thérapie immuno-suppressive) peuvent altérer cet équilibre et, en conséquence, peuvent modifier la santé du système digestif. Dans ce contexte, l'administration des probiotiques favorise le maintien de l'équilibre ou sa résistance à la modification chez une personne en santé, en prévenant l'apparition des différentes maladies.

Le tract gastro-intestinal a le rôle de protéger l'organisme contre les agents pathogènes et, en même temps, doit offrir un environnement tolérant pour la variété d'antigènes présents à ce niveau-ci. Cette tolérance orale contribue à la suppression de la réponse immunitaire mucoale par la variété d'antigènes qui se trouvent dans nourriture et qui sont présents dans la flore intestinale normale. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans le processus de l'induction de la tolérance orale, et ces mécanismes peuvent soit ignorer l'antigène, en prévenant l'antigène d'avoir accès aux régions immuno-réactives du tract intestinal, soit impliquer l'induction des réponses anti-inflammatoires et/ou l'élimination des cellules B ou T (Huffnagle et Noverr, 2008). La tolérance orale est typiquement caractérisée par la suppression de la réponse systémique de type Th1 à la présence de l'antigène et par des niveaux élevés d'interleukine IL-10 et IgA à la surface mucoale. La réponse de type Th2 contribue à l'induction de la tolérance au niveau de l'intestin par la production de l'IL-4 et IL-5 qui peuvent agir de façon synergique, en augmentant la production de IgA et en inhibant la réponse de type Th1. Ainsi, au niveau de l'intestin, il y a un environnement qui est tolérant pour les antigènes alimentaires et protecteur contre les pathogènes potentiels, une bonne homéostasie intestinale étant ainsi maintenue (Huffnagle et Noverr, 2008).

3.2.5 Les bactéries lactiques

Au début du 20^{ème} siècle, Elie Metchnikoff (Prix Nobel de physiologie et de médecine en 1908) a indiqué pour la première fois que les bactéries lactiques peuvent avoir un effet bénéfique sur la santé. Durant les années 1930, Minoru Shirota a mentionné que plusieurs maladies pourraient être évitées si une microflore intestinale optimale est maintenue. Pendant la période suivante, plusieurs études ont montré l'effet bénéfique des bactéries lactiques.

La caractéristique commune des bactéries lactiques est la production d'acide lactique suite à la fermentation. Les bactéries lactiques sont des bactéries Gram-positives sous forme de bâtonnets rectilignes plus ou moins étirés, en général immobiles. Ces bactéries peuvent être aéro-tolérantes ou anaérobiques strictes. Le milieu de culture MRS (Man, Rogosa et Sharpe) est le plus utilisé pour la culture des bactéries lactiques. Les bactéries lactiques utilisées comme probiotiques appartiennent généralement aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacter*, et les principales espèces utilisées sont représentées par: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. lactis*, *B. brevis*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. bifidum* (Figure 3.2).

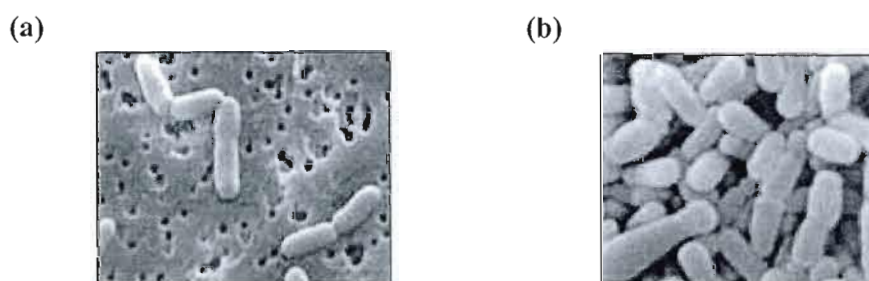


Figure 3.2: Images de microscopie électronique des bactéries lactiques
(a) *Lactobacillus* et (b) *Bifidobacter*
(source: <http://www.customprobiotics.com>).

3.2.5.1 Les effets bénéfiques des bactéries lactiques sur la santé humaine et leurs mécanismes d'action

Les bactéries lactiques exercent de nombreuses fonctions biochimiques et physiologiques, notamment: elles peuvent contribuer comme complément à la fermentation des nutriments, ont un effet de barrière dans la protection du système digestif contre les bactéries pathogènes, et stimulent le système immunitaire. En plus, d'autres fonctions peuvent être ajoutées: elles peuvent éliminer l'intolérance au lactose et prévenir la carcinogénèse. Le mode d'action de ces bactéries est complexe et pas complètement connu (Guarner et Malagelada, 2003).

Inhibition des pathogènes

Les effets d'inhibition des pathogènes par les bactéries lactiques sont dus aux plusieurs mécanismes:

- la sécrétion d'acides (*i.e.* acide lactique), ce qui contribue à la diminution du pH intestinal, en créant ainsi des conditions défavorables aux bactéries pathogènes,
- l'adhésion sur la muqueuse intestinale, en empêchant la colonisation des bactéries pathogènes (compétition pour l'occupation des sites de colonisation),
- la compétition métabolique entre les bactéries lactiques et les pathogènes,
- la production des bactériocines.

De nombreuses souches de bactéries lactiques ont fait l'objet de cette approche: *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *B. bifidum* etc. L'association de plusieurs souches présente un pouvoir inhibiteur plus important des bactéries pathogènes que celui des souches seules (Appela *et al.*, 1992).

Contrecarrer l'intolérance au lactose

Chez certaines personnes, il y a l'apparition des symptômes digestifs après l'ingestion de lait suite à leur incapacité de digérer le lactose à cause du manque de la

β -galactosidase (lactase). Toutefois, chez les mêmes personnes souffrant de l'intolérance au lactose, les yogourts contenant des probiotiques peuvent être assez bien digérés. Ainsi, en présence des probiotiques (*i.e.* *L. sporogenes*), il y a la production de l'enzyme nécessaire (lactase) pour hydrolyser le lactose (Kim *et al.*, 1985).

Prévention de la carcinogénèse

Au niveau de l'épithélium intestinal, l'équilibre entre la croissance et l'élimination cellulaire est maintenu par plusieurs processus cellulaires (prolifération, arrêt de croissance, apoptose). Plusieurs facteurs contrôlent l'homéostasie épithéliale, et un possible déséquilibre peut conduire à une prolifération anarchique des cellules, favorisant l'apparition des cancers. Certaines bactéries lactiques peuvent limiter directement ce processus (Rafter, 1995). Leur mécanismes sont basés sur:

- la stimulation de la réponse immunitaire de l'hôte, par l'induction de la production de plusieurs cytokines, comme interféron-gamma (IFN-gamma), interleukines (IL-1 β , IL-6), facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF-alpha), en ayant comme résultat l'inhibition de la croissance tumorale (Matsuzaki, 1998; Sekine, Kawashima et Hashimoto, 1994).
- la neutralisation des composés carcinogènes qui arrivent ou qui se forment au niveau de l'intestin, par la capacité des bactéries de lier ces composés (Morotomi et Mutai, 1986).
- la diminution ou la suppression totale des certains enzymes présentes dans l'intestin qui peuvent convertir les produits pro-carcinogènes en produits carcinogènes (*i.e.* β -glucuronidase peut hydrolyser plusieurs glucuronides, en libérant ainsi des produits carcinogènes dans le lumen intestinal). Ainsi, la diminution de l'activité de certaines enzymes (*i.e.* β -glucuronidase, nitroréductase et azoréductase) suite à l'administration de *L. acidophilus* pourrait expliquer l'incidence réduite des cancers de côlon (Goldin et Gorbach, 1980).

- la modulation de la prolifération épithéliale, avec une diminution de la prolifération cellulaire et une diminution de l'activité enzymatique de l'ornithine décarboxylase (Reddy, 1998). Il a été aussi montré que le facteur de croissance tumorale-alpha (TGF-alpha) est exprimé de façon non-contrôlée par les cellules néoplasiques, en conduisant à leur prolifération excessive (Sporn et Todaro, 1980). Ainsi, cette production non-contrôlée de TGF-alpha pourrait jouer un rôle dans les transformations néoplasiques.

Tel que mentionné, plusieurs mécanismes possibles pourraient expliquer le rôle bénéfique des bactéries lactiques dans le processus de développement des tumeurs au niveau intestinal. Toutefois, pour chaque souche bactérienne, il reste à déterminer les mécanismes prédominants.

Immuno-stimulation et immuno-modulation

Un autre mécanisme d'action des bactéries lactiques est représenté par la stimulation du système immunitaire. Plusieurs études ont mis en évidence une augmentation de la réponse immunitaire humorale et cellulaire suite à un traitement avec *Lactobacillus* (Kaila *et al.*, 1992; Vitini *et al.*, 2000). Vitini et ses collaborateurs ont montré que la majorité des bactéries lactiques testées a déterminé l'augmentation du nombre des cellules B productrices d'immunoglobulines IgA au niveau de la *lamina propria* du petit intestin. Après l'activation des cellules T par des antigènes, ces cellules produisent une variété des lymphokines (*i.e.* IL-4, IL-5) qui influencent la réponse des autres éléments cellulaires du système immunitaire. Ainsi, les IL-4 et IL-5, vont contribuer à la croissance et à la différenciation des cellules B dans des cellules qui produisent des anticorps. Toutefois, l'augmentation du nombre des cellules B n'a pas été toujours corrélée avec une augmentation du nombre des cellules T CD4⁺. Les cellules T CD8⁺, soit ont diminué en nombre, soit n'ont pas été affectées, avec l'exception du *L. plantarum* qui a déterminé leur augmentation à une dose faible (Vitini *et al.*, 2000). Quelques mécanismes d'action des probiotiques sont illustrés dans la Figure 3.3.

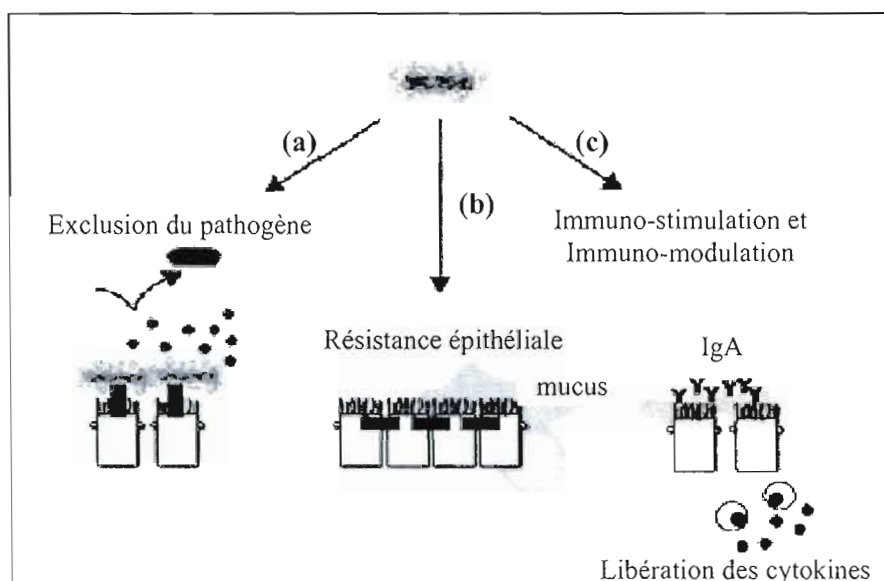


Figure 3.3: Mécanismes possibles d'action des probiotiques sur (a) la microflore ou via (b) l'effet de résistance épithéliale ou (c) du système immunitaire (*adaptation d'après* Mahida et Rolfe, 2004).

Autres effets bénéfiques des bactéries lactiques

Certaines études ont montré que les bactéries lactiques peuvent améliorer les symptômes de la diarrhée associée à l'usage des antibiotiques, de la gastro-entérite ou du syndrome de l'intestin irritable, ou diminuer l'inflammation intestinale (Marteau *et al.*, 2001). Les bactéries lactiques peuvent aussi résoudre les infections uro-génitales (Reid *et al.*, 2001) par l'activation des lymphoblastes B qui vont proliférer et entrer dans le trafic lymphocytaire, en arrivant aux niveau des surfaces mucosales des autres systèmes et en produisant ainsi une réponse immunitaire locale, telle que la production des immunoglobulines IgA.

3.2.6 Utilisation des probiotiques pour contrôler les maladies inflammatoires de l'intestin

Les maladies inflammatoires de l'intestin, le plus représentées par la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn, sont des maladies chroniques associées avec une inflammation non-contrôlée de l'intestin. Récemment, il a été estimé que ces maladies affectent plus d'un million de personnes sur le continent nord-américain. L'étiologie des maladies inflammatoires de l'intestin n'est pas bien connue, mais plusieurs facteurs environnementaux, génétiques et immunologiques seraient impliqués dans leur développement (Hanauer, 2006). La maladie de Crohn peut apparaître dans tous les segments de l'intestin en ayant à la base une réponse immunitaire de type Th1, caractérisée par une augmentation de l'expression de IL-12, suivie par IFN-gamma et TNF-alpha (Papadakis et Targan, 2000). Différemment, la colite ulcéreuse peut apparaître seulement au niveau du côlon ayant à la base une réponse immunitaire de type Th2, ce qui conduit à une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-5 (Papadakis et Targan, 2000).

Pour préserver l'homéostasie intestinale, une relation symbiotique entre l'hôte et les bactéries commensales doit être maintenue (Hanauer, 2006). Dans le cas des maladies inflammatoires de l'intestin, les personnes prédisposées génétiquement (*i.e.* mutations au niveau du gène CARD15/NOD2 qui codifie une protéine impliquée dans la reconnaissance bactérienne) perdent la tolérance normale vers les bactéries commensales de l'intestin. Ainsi, une réponse immunitaire élevée contre les bactéries commensales du tube digestif serait impliquée dans le développement de ces maladies chez les individus qui sont susceptibles génétiquement (Sartor, 2004). Comme la microflore intestinale semble jouer un rôle dans le développement de ces maladies, une des méthodes pour contrôler la réponse inflammatoire peut être représentée par l'administration des probiotiques. Ainsi, les effets bénéfiques de certains probiotiques sur l'inflammation intestinale sont actuellement très explorés. Plusieurs études ont montré que les probiotiques, administrés seuls ou en combinaison avec des

prébiotiques, réduisent les lésions inflammatoires de la muqueuse intestinale. Ainsi, l'administration de *Lactococcus lactis* peut réduire la sévérité de la colite ulcéreuse par la production de IL-10, une cytokine anti-inflammatoire (Steidler *et al.*, 2000). D'autres évidences pour l'usage des espèces de *Lactobacillus* et *Bifidobacter* dans le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin ont été apportées. Osman et ses collaborateurs (2004) ont montré qu'un prétraitement de sept jours avec *L. plantarum* et *B. infantis* réduit le développement de la colite induite chez les rats. Des études chez l'humain sur l'utilisation des probiotiques dans le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin ont aussi obtenu des résultats prometteurs (Bibiloni *et al.*, 2005; Furrie *et al.*, 2005; Schultz *et al.*, 2004). Dans l'étude du Bibiloni (2005), 53% des patients souffrant de colite ulcéreuse ont été en rémission après avoir ingéré des probiotiques pendant une période de six semaines. Un pourcentage de 9% des patients qui n'ont pas répondu a été rapporté dans la même étude. Bien que d'autres études soient nécessaires pour confirmer le rôle bénéfique de certains probiotiques dans les maladies inflammatoires intestinales, les résultats obtenus à date sont encourageants et permettent de penser que certains probiotiques et/ou synbiotiques pourraient être des adjuvants nutritionnels utiles dans le traitement de ces maladies. Pour que les probiotiques puissent représenter une option thérapeutique reconnue dans le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin, il y a le besoin de: (i) sélectionner les probiotiques qui ont la plus grande efficacité dans chaque type de maladie inflammatoire de l'intestin, (ii) déterminer si ces probiotiques sont plus efficaces seuls ou en combinaison avec autres probiotiques ou prébiotiques, (iii) considérer les possibles effets secondaires que ces préparations peuvent avoir et les effets sur la réponse immunitaire, (iv) connaître le temps que ces espèces peuvent rester au niveau du tractus intestinal et leur résistance aux conditions gastro-intestinales pour pouvoir déterminer la dose nécessaire et la fréquence d'administration.

3.3 Métallo-enzymes avec potentiel thérapeutique

3.3.1 Les amine oxydases - généralités

Les amine oxydases (AO), largement distribuées dans le monde vivant, catalysent la déamination oxydative de plusieurs amines biogènes, avec la formation de l'aldéhyde correspondant, du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et de l'ammoniaque (NH₃) (Mondovi et Finazzi, 1982):



On peut classer les AO en deux groupes en fonction de la nature du groupe prosthétique impliqué dans le mécanisme d'action catalytique (Mondovi et Finazzi, 1982): les AO avec flavine adénine dinucléotide (FAD-AO, *i.e.* monoamine oxydase, polyamine oxydase) et les AO à cuivre (Cu-AO, *i.e.* amine oxydase sérique, diamine oxydase).

3.3.1.1 La structure des amine oxydases à cuivre

Les Cu-AO (EC 1.4.3.6) sont des oxydoréductases représentées par des dimères avec une masse moléculaire de 70-95 kDa/monomère. Les Cu-AO contiennent un cofacteur (lié par une liaison covalente) représenté par le 2,4,5-trihydroxyphénylalanine quinone (TPQ) qui provient de la modification d'un résidu de tyrosine endogène (Klinman et Mu, 1994). Le site actif de l'enzyme contient aussi un ion de cuivre qui est impliqué dans la biogénèse du TPQ (Cai et Klinman, 1994) et dans le processus catalytique de déamination oxydative des amines.

La structure des Cu-AO a été déterminée chez *Escherichia coli*, ECAO (Parsons *et al.*, 1995), *Arthrobacter globiformis*, AGAO (Wilce *et al.*, 1997), *Hansenula polymorpha*, HPAO (Li, Klinman et Mathews, 1998), *Pisum sativum*, PSAO (Kumar *et*

al., 1996), *Pichia pastoris*, PPAO (Duff *et al.*, 2003) et sérum bovin, BSAO (Lunelli *et al.*, 2005). Des études de cristallisation et des résultats préliminaires de rayons X ont été aussi rapportés pour une AO humaine représentée par la protéine d'adhésion vasculaire-1, VAP-1 (Nymalm *et al.*, 2003). La protéine d'adhésion VAP-1 est une Cu-AO avec une homologie proche du BSAO, mais avec une activité amine oxydasique très faible (Salminen *et al.*, 1998). Les structures des Cu-AO sont en général très semblables (Mondovi et Finazzi-Agro, 1982), avec une région des acides aminés conservée au niveau du site actif, région qui est située près de la partie carboxyl-terminale. Parmi les résidus conservés d'acides aminés, il y a la tyrosine qui est transformée en TPQ, trois résidus d'histidine qui lient le cuivre et un résidu d'acide aspartique qui est important pour la conversion du substrat. La structure de l'ECAO (Figure 3.4) est représentative pour toutes les structures connues des Cu-AO. La différence primaire est la présence ou l'absence du domaine amino-terminal (D1), qui est présent dans ECAO, mais pas dans AGAO, HPAO, PSAO ou BSAO. Le site actif de chaque monomère est localisé dans le domaine carboxyl-terminal (D4). Chaque site actif du Cu-AO est représenté par Cu(II) qui est coordonné avec les groupes imidazole de trois résidus d'histidine et avec deux molécules d'eau. Le TPQ se trouve près du Cu(II): sans être liés directement un de l'autre, ils sont connectés par au moins une molécule d'eau (Brazeau, Johnson et Wilmot, 2004).

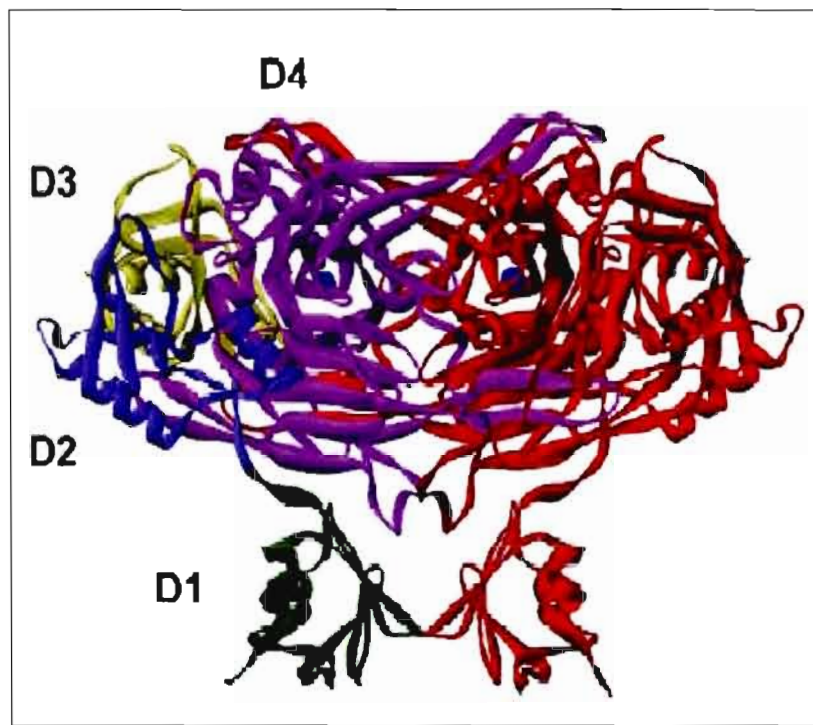
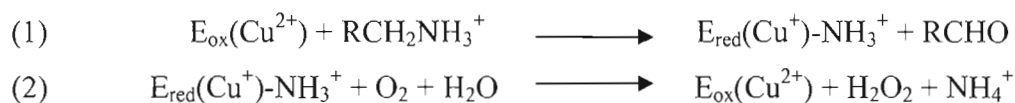


Figure 3.4: La structure de l'amine oxydase (Cu-AO) provenant de l'*Escherichia coli* (ECAO). Un monomère est coloré en rouge et l'autre monomère est coloré par domaines (D1 vert, D2 blue, D3 jaune et D4 violet). Les ions de cuivre sont représentés par des sphères bleues (d'après Brazeau, Johnson et Wilmot, 2004).

3.3.1.2 Le mécanisme catalytique des amine oxydases à cuivre

Le mécanisme des Cu-AO est représenté par deux réactions: (1) *la réaction réductrice* (déamination oxydative en obtenant l'enzyme réduite avec la libération de l'aldéhyde) et (2) *la réaction oxydative* qui utilise l'oxygène pour ré-oxyder l'enzyme, avec la production de NH_3 et H_2O_2 (Brazeau, Johnson et Wilmot, 2004).



L'étape initiale dans la réaction de réduction de l'enzyme implique l'attaque nucléophile du groupe amine (appartenant au substrat) à la position C-5 du TPQ (Figure 3.5A,B), avec la formation d'une base Schiff (1) (Figure 3.5B). Ensuite, un résidu conservé d'acide aspartique extrait un proton avec la formation des carbanions (Figure 3.5C) qui vont se réarranger pour former une base Schiff (2) (Figure 3.5D). Par une réaction d'hydrolyse, l'aldéhyde se forme et le TPQ oxydé est réduit à l'état d'aminoquinol (Figure 3.5E). En solution, l'intermédiaire Cu(II)-aminoquinol de l'enzyme est en équilibre avec le Cu(I)-semiquinone (Figure 3.5E-F). Toutefois, la quantité de Cu(I)-semiquinone observée peut être différente selon la source d'enzyme. Le mécanisme de la réaction réductrice (Figure 3.5A-E) est bien compris et accepté pour toutes les Cu-AO. Dans la réaction oxydative (Figure 3.5E-G), l'oxygène moléculaire se lie à l'enzyme et accepte deux électrons et deux protons de l'aminoquinol, ce qui conduit à la libération de H_2O_2 et à la formation d'iminoquinone (Figure 3.5G). L'hydrolyse de l'iminoquinone libère NH_3 et régénère le TPQ oxydé, qui peut ainsi participer dans un autre cycle catalytique. Le mécanisme de la réaction oxydative n'est pas bien compris comme le mécanisme de la réaction réductrice et constitue le sujet de plusieurs investigations actuelles (Brazeau, Johnson et Wilmot, 2004).

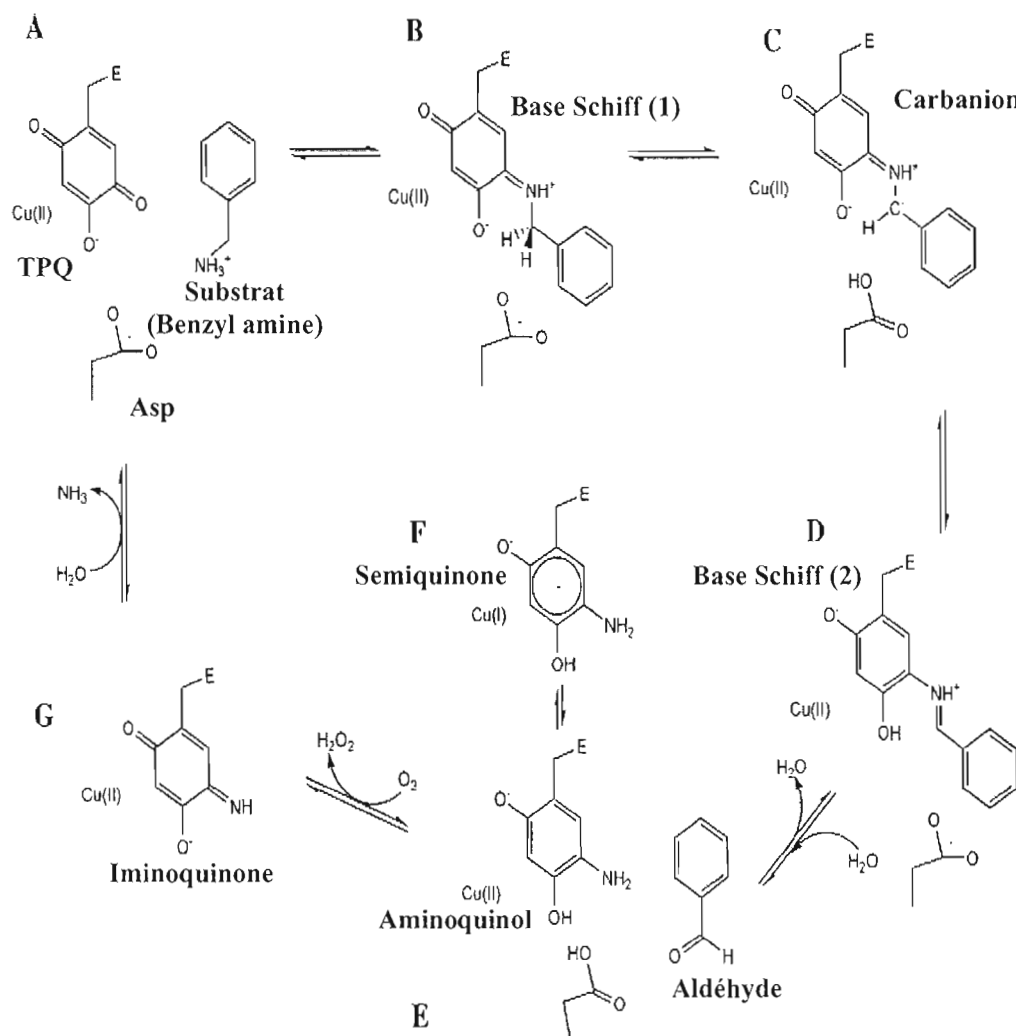


Figure 3.5: Représentation schématique du mécanisme catalytique des amine oxydases à cuivre (Cu-AO).

Le TPQ (2,4,5-trihydroxyphénylalanine quinone) est le cofacteur des Cu-AO. Le substrat montré est la benzyl amine, un substrat typique pour certaines AO (*adapté d'après* Brazeau, Johnson et Wilmot, 2004).

Quelques différences existent toutefois entre les Cu-AO provenant des différentes sources, concernant la réactivité des sous-unités et l'habilité de former l'intermédiaire Cu(I)-semiquinolamine (Pietrangeli *et al.*, 2003). Par exemple, la formation de la base Schiff(2) et la libération de l'aldéhyde sont plus lentes dans le cas de l'AO provenant du sérum bovin que dans le cas de l'AO provenant des lentilles (Bellelli *et al.*, 1991).

3.3.1.3 La diamine oxydase (histaminase)

La diamine oxydase (DAO, EC 1.4.3.6) est un membre de la classe des Cu-AO et catalyse la déamination oxydative de l'histamine et d'autres amines biogènes comme la cadavérine et la putrescine. La DAO est aussi connue sous le nom d'histaminase (Mondovi *et al.*, 1964) dû au fait que cette enzyme participe à la dégradation de l'histamine. Chez la majorité des mammifères, la DAO est présente au niveau du tractus intestinal. L'enzyme est localisée au niveau de la muqueuse intestinale et à l'intérieur des cellules, en général dans le cytoplasme. L'analyse de la localisation subcellulaire de la DAO intestinale chez le porc a suggéré que l'enzyme est présente dans des structures vésiculaires qui forment un réseau situé près de la membrane plasmique des cellules (Schwelberger, Hittmair et Kohlwein, 1998). Les villosités intestinales contiennent la DAO, ce qui suggère que le dommage au niveau de ces villosités peut avoir un impact significatif sur le niveau d'enzyme qui se trouve dans la muqueuse intestinale (Fogel, Toporowska-Kowalska et Stasiak, 2009).

La DAO a été aussi isolée à partir de plusieurs sources végétales: *Pisum sativum*, *Lathyrus sativus*, *Cicer arietinum*, *Lens culinaris*, etc, les DAO provenant du *Pisum sativum* et *Lens culinaris* étant les plus étudiées et caractérisées. Les séquences des acides aminés sont connues pour plusieurs DAO végétales. En analysant la structure primaire de la DAO provenant de plusieurs sources (pois vert, lentilles, pois chiche, soya), 70% de la structure primaire a été invariable, la majorité des résidus d'acides aminés situés près du site actif de l'enzyme étant conservés (Guss, Zanotti et Salminen,

2009). Ainsi, la DAO provenant de deux sources végétales, *Pisum sativum* (PSAO) et *Lathyrus cicera* (LCAO) présente des activités similaires envers les mêmes substrats, et ces enzymes végétales sont plus réactives avec les diamines aliphatiques et l'histamine que la BSAO (Pietrangeli *et al.*, 2007). En général, la DAO végétale a une affinité plus élevée pour les substrats diamine à la place des substrats monoamine, avec une valeur élevée de la k_{cat} pour la putrescine (Tableau 3.1).

L'enzyme provenant du *Lathyrus sativus* a été rapportée la première fois par Suresh, Ramakrishna et Adiga (1976). Cette enzyme a une masse moléculaire d'approximativement 150 kDa/dimère et de 75 kDa/sous-unité monomérique (Suresh et Adiga, 1979). La spécificité de substrat et la sensibilité de cette enzyme envers plusieurs inhibiteurs semblent similaires avec les oxydases provenant des lentilles et du pois vert (Medda, Padiglia et Floris, 1995). La DAO d'origine végétale présente une activité spécifique supérieure aux amine oxydases d'origine animale et elle a été proposée pour le traitement général de plusieurs pathologies liées à l'histamine (Mondovi *et al.*, 2002). Ainsi, la DAO végétale a été proposée pour le traitement du choc allergique et de l'asthme (Mondovi *et al.*, 2002; Masini *et al.*, 2004), en ayant des effets bénéfiques en anaphylaxie (Masini *et al.*, 2002) et de cardio-protection (Masini *et al.*, 2003). Récemment, Masini et ses collaborateurs (2007) ont montré que la DAO provenant du pois vert, peut avoir des effets protecteurs dans l'ischémie intestinale, en réduisant l'inflammation par une accélération du métabolisme de l'histamine et par une diminution des dommages tissulaires (Masini *et al.*, 2007).

Tableau 3.1: Les paramètres cinétiques (k_{cat} , K_m) et l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) des amines oxydases provenant du *Lathyrus cicera* (LCAO), *Pisum sativum* (PSAO) et sérum bovin (BSAO), à 25 °C

| Substrat | pH 7.2 | | |
|-----------------------|--------------------------------------|----------------------|--|
| | k_{cat} (s^{-1}) | K_m (M) | k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$) |
| <i>LCAO</i> | | | |
| Putrescine | 262 | 2.7×10^{-4} | 9.7×10^5 |
| Cadavérine | 159 | 1.0×10^{-4} | 1.6×10^6 |
| Spermidine | 100 | 2.1×10^{-3} | 4.8×10^4 |
| Agmatine | 45.9 | 4.9×10^{-4} | 9.4×10^4 |
| Tyramine | 32.9 | 3.1×10^{-3} | 1.1×10^4 |
| Spermine | 28.3 | 6.3×10^{-4} | 4.5×10^4 |
| Phényléthylamine | 15.8 | 1.2×10^{-3} | 1.3×10^4 |
| Histamine | 10.3 | 7.9×10^{-4} | 1.3×10^4 |
| 3-Aminométhylpyridine | 7.6 | 5.8×10^{-4} | 1.3×10^4 |
| Benzylamine | 3.7 | 2.9×10^{-4} | 9.0×10^3 |
| 4-Aminométhylpyridine | 3.0 | 1.0×10^{-4} | 3.0×10^4 |
| 2-Aminoéthylpyridine | 0.97 | 1.6×10^{-4} | 6.1×10^3 |
| 2-Aminométhylpyridine | 0.47 | 3.1×10^{-5} | 1.5×10^4 |
| <i>PSAO</i> | | | |
| Putrescine | 281 | 4.3×10^{-4} | 6.5×10^5 |
| Spermidine | 115 | 2.9×10^{-3} | 4.0×10^4 |
| Tyramine | 27.7 | 2.3×10^{-3} | 1.2×10^4 |
| Phényléthylamine | 10.6 | 8.2×10^{-4} | 1.3×10^4 |
| Benzylamine | 2.8 | 2.8×10^{-4} | 1.0×10^4 |
| 4-aminométhylpyridine | 3.9 | 9.6×10^{-5} | 4.1×10^4 |
| <i>BSAO</i> | | | |
| Spermine | 2.04 | 7.3×10^{-5} | 2.8×10^4 |
| Spermidine | 1.87 | 1.7×10^{-4} | 1.1×10^4 |
| Benzylamine | 1.23 | 1.7×10^{-3} | 7.3×10^2 |
| 4-Aminométhylpyridine | 1.21 | 6.7×10^{-6} | 1.8×10^5 |
| 3-Aminométhylpyridine | 0.66 | 3.0×10^{-4} | 2.2×10^3 |
| 2-Aminométhylpyridine | 0.40 | 1.6×10^{-4} | 2.5×10^3 |
| Phényléthylamine | 0.37 | 8.4×10^{-4} | 4.4×10^2 |
| 2-Aminoéthylpyridine | 0.34 | 1.4×10^{-4} | 2.5×10^3 |
| Tyramine | 0.085 | 6.5×10^{-4} | 1.3×10^2 |
| Histamine | 0.024 | 2.4×10^{-3} | 1.0×10 |
| Putrescine | 0.017 | 1.3×10^{-2} | 1.3 |

(d'après Pietrangeli *et al.*, 2007)

3.3.1.4 L'implication de la diamine oxydase dans le métabolisme de l'histamine

L'histamine, 2-(4-imidazolyl)éthylamine, a été découverte en 1910 par Dale et Laidlaw. L'histamine appartient aux amines biogènes et est synthétisée à partir de l'histidine par les mastocytes, les basophiles, les plaquettes ou les neurones histaminergiques. Ensuite, elle est gardée dans des vésicules intracellulaires et libérée après stimulation. Différents stimuli (*i.e.* allergènes spécifiques, neuropeptides, cytokines, lipoprotéines) contribuent à la dégranulation de ces vésicules et à la libération de l'histamine (Vlieg-Boerstra *et al.*, 2005). Une fois libérée, l'histamine se lie à ses quatre récepteurs H₁-H₄ existants à la surface des cellules appartenant au système digestif: les cellules épithéliales, musculaires, endothéliales ou les neurones intestinaux (Fogel, Lewinski et Jochem, 2005). Ceci détermine l'apparition d'une multitude d'effets, *i.e.* la contraction des cellules musculaires, la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de la sécrétion du mucus, des changements de pression sanguine, l'arythmie, la stimulation de la sécrétion d'acide gastrique, etc (Maintz et Novak, 2007).

Le métabolisme de l'histamine est présenté dans la Figure 3.6. Ainsi, l'histamine est synthétisée à partir de l'histidine par une réaction de décarboxylation, en présence de *L*-histidine décarboxylase (Figure 3.6, étape 1). Ensuite, l'histamine peut être métabolisée par deux processus: soit par la déamination oxydative catalysée par DAO (Figure 3.6, étape 2), soit par la méthylation catalysée par *N*-méthyltransférase, HNMT (Figure 3.6, étape 3), et ceci est en fonction de sa localisation. La DAO se trouve au niveau des cellules épithéliales dans des structures vésiculaires associées à la membrane plasmatique et est libérée suite à la stimulation de ces cellules (Schwelberger, Hittmair et Kohlwein, 1998). Il a été suggéré que DAO est responsable de la dégradation de l'histamine extracellulaire qui provient de l'ingestion des aliments riches en histamine. La HNMT, la deuxième enzyme qui contribue à la dégradation de l'histamine, est localisée au niveau du cytosol (Brown, Tomchick et Axelrod, 1959) et peut dégrader l'histamine seulement dans l'espace intracellulaire. Les deux enzymes

peuvent être inhibées par leurs produits de réaction (Figure 3.6, étape 4). La *N*-méthylhistamine peut être transformée en *N*-méthylimidazole acétaldéhyde par la monoamine oxydase-B (MAO-B) ou par la DAO (Figure 3.6, étape 5). Chez les mammifères, la DAO se trouve dans des tissus spécifiques, comme le petit intestine, le côlon ascendant, le placenta et les reins. La HNMT est aussi exprimée dans les reins, le foie et le côlon.

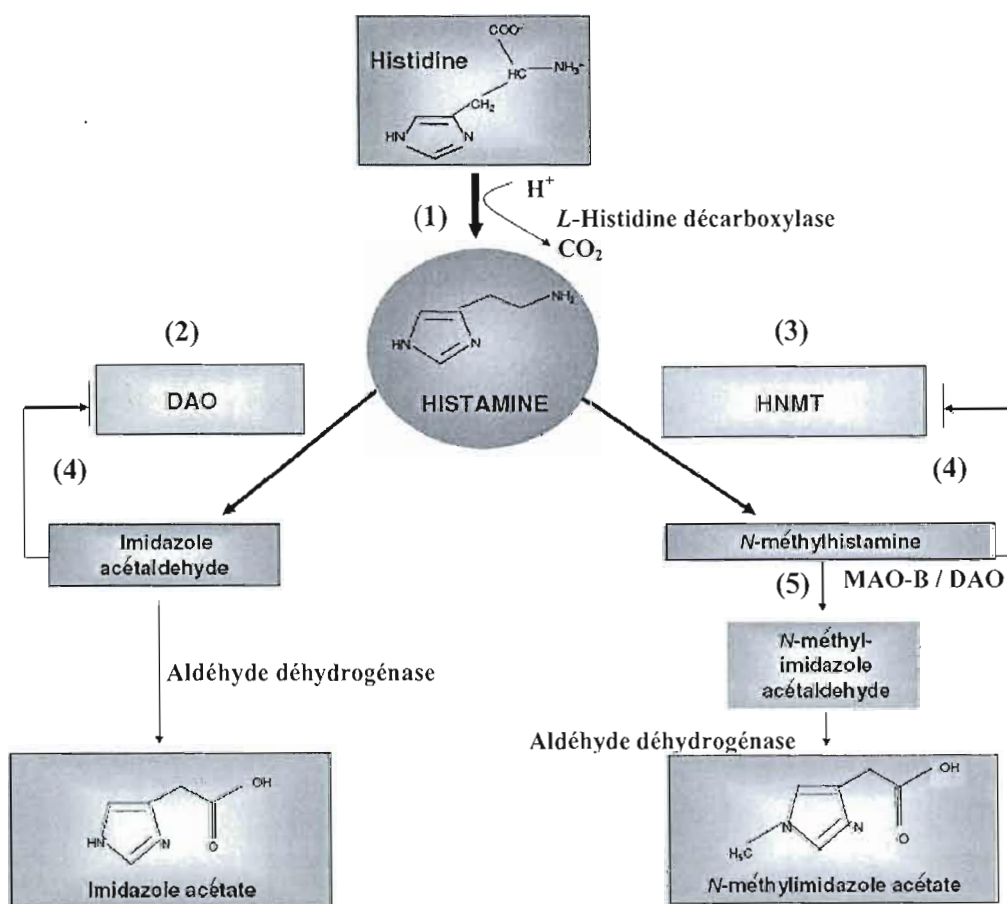


Figure 3.6: Le métabolisme de l'histamine (adaptation d'après Maintz et Novak, 2007). DAO: diamine oxydase, MAO-B: monoamine oxydase-B, HNMT: N-méthyltransférase.

3.3.1.5 L'intolérance à l'histamine

L'intolérance à l'histamine s'installe à cause d'un déséquilibre entre l'histamine produite et sa dégradation. Approximativement 1% de la population souffre de l'intolérance à l'histamine. L'augmentation de la disponibilité en histamine peut avoir une origine endogène (*i.e.* la supra-production de l'histamine à cause des allergies) ou une origine exogène. Ainsi, une ingestion des aliments riches en histamine (Sattler *et al.*, 1988) ou des médicaments (Wantke *et al.*, 2001), qui libèrent l'histamine ou bloquent la DAO, a comme résultat une accumulation d'histamine qui peut causer des différents symptômes, tels que la diarrhée, des maux de tête, de l'hypotension, de l'arythmie etc. La cause majeure de l'intolérance à l'histamine pourrait être liée à sa faible dégradation enzymatique due à une diminution ou une suppression de l'activité de la DAO ou de la HNMT.

3.3.1.6 Les fonctions de l'amine oxydase à cuivre chez les plantes

La DAO végétale (EC 1.4.3.6) est exprimée aux niveaux élevés chez les dicotylédons, au niveau des germes de pois vert, lentilles, soya, etc. La présence des AO chez les plantes n'est pas liée seulement à la régulation des niveaux cellulaires d'amines. Les AO contribuent aussi à d'autres processus physiologiques importants par la présence de leurs produits de réaction. Ainsi, le 4-aminobutanol, le produit de réaction de la DAO en ayant comme substrat la putrescine, peut être transformé en acide gamma-aminobutyrique (GABA) en présence d'un aldéhyde déhydrogénase. Le GABA est un métabolite important qui est associé avec différents processus physiologiques tel que la régulation du pH cytosolique, la protection contre le stress oxydatif et la signalisation, intervenant dans la régulation des concentrations de Ca^{2+} endogène (Yu *et al.*, 2006). Le GABA est produit rapidement dans des conditions de stress biotique ou abiotique (Bouché et Fromm, 2004). Le H_2O_2 , un autre produit de l'activité enzymatique de la DAO, a un rôle clé dans le développement et la défense des plantes (Cona *et al.*, 2006; Rea *et al.*, 2002). Ainsi, une balance entre la production

de H_2O_2 intracellulaire ou au niveau de la paroi cellulaire pourrait contrôler le taux de croissance cellulaire. L'implication de la DAO dans la réticulation extracellulaire des protéines structurales ou des précurseurs de la lignine a été suggérée chez *Arabidopsis* durant les interactions avec des parasites (Moller *et al.*, 1998). La DAO est aussi impliquée dans les interactions symbiotiques entre les plantes et les bactéries par la prévention de la colonisation des tissus de l'hôte, en modulant la dureté de la paroi cellulaire (Wisniewski *et al.*, 2000).

3.3.2 Les enzymes héminiques - la catalase

3.3.2.1 Le stress oxydatif

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre de la balance entre les molécules pro-oxydantes et celles anti-oxydantes en faveur des premières, ce qui peut conduire à des dommages cellulaires (Sies, 1997). Parmi les espèces réactives d'oxygène (ERO) on retrouve les radicaux libres, comme l'anion superoxyde (O_2^-) ou le radical hydroxyle (HO^\cdot), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$). Toutes ces espèces sont potentiellement toxiques pour l'organisme car elles peuvent conduire à des dégâts cellulaires irréversibles au niveau des lipides, protéines, enzymes, carbohydrates et acides nucléiques (ADN), tels que des dégâts aux membranes cellulaires (*i.e.* la peroxydation des lipides membranaires), l'apparition des mutations dans l'ADN, etc. Le stress oxydatif est impliqué dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques, tels que les états inflammatoires aigus, le vieillissement, le cancer, les maladies auto-immunes, cardio-vasculaires ou neuro-dégénératives (Ratnam *et al.*, 2006).

3.3.2.2 Le métabolisme du peroxyde d'hydrogène

Chez les mammifères, le H_2O_2 occupe une position centrale dans la famille des ERO. L'élimination de H_2O_2 est très importante pour les cellules, car son excès peut contribuer à l'oxydation des différents composés cellulaires. Les principales voies métaboliques du H_2O_2 sont montrées dans la Figure 3.7 (Agostinelli et Seiler, 2006). Ainsi, le $\text{O}_2^{\cdot -}$ contribue à la formation du H_2O_2 en présence de la superoxyde dismutase (SOD). De plus, il y a des nombreuses oxydases qui utilisent l'oxygène moléculaire comme substrat pour former le H_2O_2 : les enzymes avec FAD comme groupe prosthétique (*i.e.* monoamine oxydase, *MAO*, polyamine oxydase, *PAO*, aminoacide oxydase, *AAO*) ou les AO contenant le cuivre (Cu-AO, comme la DAO). En ce qui concerne le catabolisme du H_2O_2 , deux enzymes du système de défense cellulaire, la peroxydase et la catalase, participent principalement à sa décomposition. Le H_2O_2 constitue aussi la source de formation des radicaux HO^{\cdot} (réaction Fenton) et d'acide hypochloreux (HClO), ce dernier se formant en présence de la myéloperoxydase lysosomale des neutrophiles (MyPO). L'activité de la MyPO peut être considérée anti- et pro-oxydante, car elle contribue à la diminution des niveaux de H_2O_2 , et, en même temps, intervient dans le processus de formation de HClO (Agostinelli et Seiler, 2006).

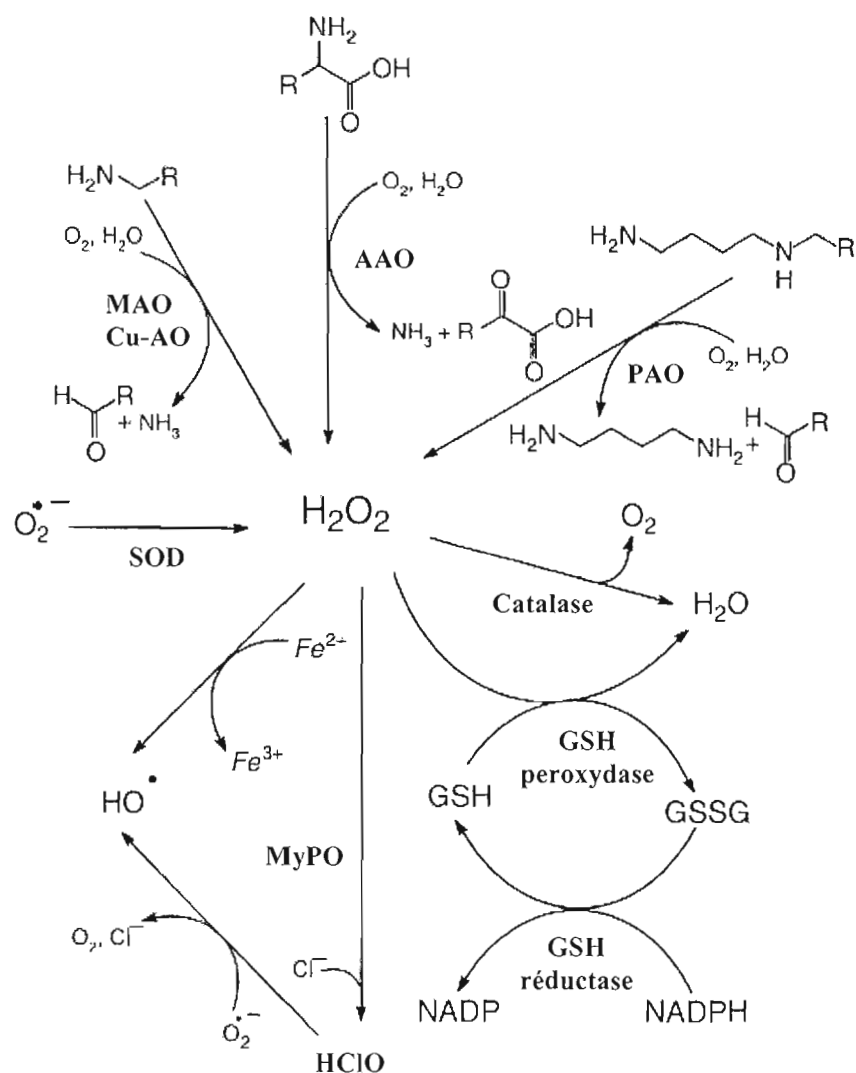


Figure 3.7: Les réactions métaboliques du peroxyde d'hydrogène. Cu-AO amine oxydase à cuivre, AAO aminoacide oxydase, GSH glutathion, GSSG glutathion (la forme oxydée), MAO monoamine oxydase, MyPO myéloperoxydase, PAO polyamine oxydase, SOD superoxyde dismutase (*adaptation d'après Agostinelli et Seiler, 2006*).

3.3.2.3 La structure et la fonction catalytique de la catalase

La catalase (EC 1.11.1.6) est une hémoprotéine représentée par quatre sous-unités identiques, avec une masse moléculaire d'environ 240 kDa. Chaque sous-unité de catalase contient un ion de fer (III) dans un noyau de protoporphyrine. La catalase se trouve à une concentration élevée dans plusieurs organes comme le foie, les reins et les érythrocytes, en étant localisée principalement au niveau des peroxysomes, mais elle peut aussi se trouver au niveau du cytosol dans les érythrocytes. La catalase se trouve dans une quantité moins importante au niveau de l'intestin. Sa fonction principale est la transformation du H_2O_2 en eau et oxygène. Pour les concentrations élevées de H_2O_2 , la catalase est la principale enzyme qui intervient dans sa décomposition, tandis que pour les traces, d'autres enzymes avec une fonction peroxydasique (*i.e.* GSH peroxydase) peuvent intervenir (Agostinelli et Seiler, 2006).

3.3.2.4 La défense contre le stress oxydatif au niveau intestinal

Les antioxydants peuvent être classifiés dans deux groupes majeurs: *les antioxydants enzymatiques*, étant représentés entre autre par la SOD (EC 1.15.1.1), la catalase (EC 1.11.1.6), la GSH peroxydase (EC 1.11.1.9), et *les antioxydants non-enzymatiques* comme les caroténoïdes, des vitamines (*i.e.* vitamine E, C), le GSH et les polyphénols (Ratnam *et al.*, 2006). Certains de ces antioxydants sont produits de façon endogène, comme des enzymes, des molécules avec une petite masse moléculaire (*i.e.*, le glutathion), et certains sont obtenus de l'alimentation. La défense non-enzymatique participe au piégeage des ERO; les molécules formées suite au piégeage, étant plus stables que les ERO, ne réagissent plus pour endommager d'autres molécules. La défense enzymatique joue un rôle important durant le stress oxydatif. Ainsi, en présence des anions $O_2^{\cdot-}$, la SOD contribue à la formation de H_2O_2 . Trois types de SOD ont été identifiés: la SOD cytosolique (CuZn-SOD), la SOD mitochondriale (Mn-SOD) et la SOD extracellulaire. Le H_2O_2 est ensuite décomposé par la catalase, tels que déjà mentionné. Dans des conditions physiologiques normales, les activités de ces enzymes

antioxydantes sont bien contrôlées pour pouvoir maintenir un niveau bas d'ERO. Toutefois, un possible déséquilibre entre la SOD et la catalase conduit à une augmentation des concentrations de H_2O_2 au niveau de l'épithélium intestinal. En fonction de sa concentration locale, le H_2O_2 peut endommager les cellules en activant la nécrose ou l'apoptose (Gardner *et al.*, 1997). La GSH peroxydase est aussi impliquée dans la décomposition du H_2O_2 (Figure 3.7). Pour pouvoir combattre le stress oxydatif, les enzymes doivent être présentes au niveau des sites où les concentrations en ERO augmentent (Ratnam *et al.*, 2006).

3.3.3 Les implications physiopathologiques de la diamine oxydase et de la catalase

Plusieurs maladies humaines sont caractérisées par l'absence, la déficience ou l'inactivation de certaines enzymes, en ayant comme résultat soit l'absence de synthèse de métabolites clés ou l'accumulation de produits toxiques dont la dégradation dépend de ces enzymes. La thérapie de remplacement de ces enzymes peut être représentée par la thérapie génique et par l'enzymothérapie. Cette dernière, grâce à sa simplicité, est plus répandue lors de déficiences enzymatiques causées par des maladies génétiques ou métaboliques.

3.3.3.1 Le cancer intestinal et la diamine oxydase

La DAO intestinale semble jouer un rôle important dans le maintien d'un niveau faible d'histamine dans le tractus intestinal. La diminution de l'activité de la DAO ou son absence ou inhibition peuvent augmenter les effets non-désirés de l'histamine. Ainsi, une diminution de l'activité de la DAO a été observée dans plusieurs maladies intestinales. Chez les patients avec adénocarcinome du côlon, la DAO présente une activité réduite au niveau de la tumeur (Boér *et al.*, 2004). Hesterberg et ses collaborateurs (1981) ont trouvé une activité de la DAO inférieure à la valeur normale dans le carcinome rectal. La réduction significative de la DAO intestinale a été

rapportée dans des études expérimentales du Kusche et ses collaborateurs (1986) sur la carcinogénèse dans le système digestive chez le rat. Ainsi, l'activité réduite de la DAO ou son inhibition complète permettent l'hyper-prolifération des cellules et augmente le risque d'apparition du carcinome intestinal. En concordance avec ces données, l'étude du Masini et ses collaborateurs (2005) a mis en évidence une corrélation entre le degré d'avancement du cancer colorectal et la concentration en histamine des tumeurs.

3.3.3.2 Les allergies alimentaires et la diamine oxydase

Les réactions allergiques alimentaires se manifestent par plusieurs symptômes, comme des douleurs abdominales, vomissements et diarrhées (Mansueto *et al.*, 2006). Les patients qui souffrent des allergies alimentaires ont une activité réduite de la DAO intestinale et des concentrations élevées en histamine dans le tissu intestinal (Fogel, Lewinski et Jochem, 2005; Raithel *et al.*, 1995). Chez l'humain, un taux élevé d'histamine peut être lié (i) à la présence des concentrations élevées en histamine dans la nourriture (*i.e.* la nourriture orientale) qui peut être contaminée avec des microorganismes (Sattler *et al.*, 1988) et/ou (ii) à la consommation de certains médicaments (*i.e.* cimetidine) qui peuvent présenter comme effet secondaire l'inhibition de la DAO (Wantke *et al.*, 2001). Des quantités élevées en histamine pourraient aussi être produites au niveau intestinal suite à un déséquilibre de la microflore intestinale. En plus, une surexpression des récepteurs spécifiques de l'histamine H₁R et H₂R a été observée chez les patients qui souffrent des allergies alimentaires ou des maladies inflammatoires de l'intestin (Sander *et al.*, 2006).

3.3.3.3 Les maladies inflammatoires de l'intestin et la diamine oxydase

Même si l'étiologie précise des maladies inflammatoires de l'intestin n'est pas encore bien établie, il y a eu un certain progrès dans l'identification des mécanismes patho-physiologiques. Tel que mentionné avant, les concepts actuels sur la pathogenèse

des maladies inflammatoires de l'intestin sont basés sur une prédisposition génétique qui est modulée par différents facteurs environnementaux (Duchmann et Zeitz, 1999). Ceci conduit aux altérations au niveau de la barrière mucoale épithéliale et a comme résultat l'augmentation de la perméabilité intestinale qui expose le système immunitaire mucoal aux antigènes bactériens de la microflore commensale. Ainsi, chez les patients qui souffrent des maladies inflammatoires de l'intestin il y aura une dérégulation de la réponse immunitaire de l'hôte et une activation inappropriée du système immunitaire intestinal. Ceci conduit à l'apparition de l'inflammation intestinale et des dommages tissulaires (Fiocchi, 1998). Durant l'inflammation, les mastocytes, qui sont largement distribués dans le tissu connectif, répondent parmi les premiers (Lee *et al.*, 2002). Ainsi, suite à l'activation par anaphylatoxines, les mastocytes libèrent l'histamine, le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF-alpha), des cytokines, tryptases, chemokines. En effet, les mastocytes et les neutrophiles (les deux activées par les anaphylatoxines) libèrent des médiateurs qui provoquent la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité endothéliale et l'extravasation de fluide (Lee *et al.*, 2002). Les macrophages sont aussi activés au début de la réaction inflammatoire, en étant parmi les premières cellules reconnaissant les pathogènes qui traversent la barrière épithéliale et qui commencent à se multiplier au niveau du tissu intestinal (Janeway *et al.*, 2005). Les macrophages présentent aussi des récepteurs pour les anaphylatoxines qui leur transmettent des signaux d'activation additionnels, en ayant comme résultat la sécrétion des cytokines et chemokines. La formation des exsudats inflammatoires permet aux médiateurs inflammatoires et aux cellules de s'accumuler aux sites inflammatoires et de lutter efficacement contre les pathogènes. Même si le but de l'inflammation est de protéger l'hôte contre les pathogènes, de réparer des dégâts, et de contribuer à l'enlèvement des cellules apoptotiques ou des complexes immuns, l'inflammation peut devenir excessive et dérégulée, et ce processus peut contribuer à l'apparition des différentes pathologies, tel que les maladies inflammatoires de l'intestin et/ou le cancer.

Les mécanismes pathologiques des maladies inflammatoires intestinales ne sont pas complètement connus. Il est déjà connu que l'activation excessive des cellules T CD4⁺ représente le principal mécanisme pathogénique qui est impliqué dans le processus d'initiation et de perpétuation du procès inflammatoire (Neurath, Finotto et Glimcher, 2002; Sartor, 1994). Ainsi, une augmentation de la prolifération et du trafic des lymphocytes T au niveau de la muqueuse intestinale (Rutgeerts, Van Deventer et Schreiber, 2003) et une production augmentée des cytokines pro-inflammatoires (Podolsky, 2002) ont été observées. De plus, l'augmentation de la résistance des cellules T à l'apoptose représente un facteur majeur dans la pathogénèse qui contribue à l'amplification de la réponse inflammatoire (Rutgeerts *et al.*, 2003). Des données récentes indiquent le rôle prédominant d'une cytokine pro-inflammatoire, IL-6 (produite par les cellules T CD4⁺ et les macrophages intestinales), dans la pathogénèse des maladies inflammatoires de l'intestin (Isaacs, Sartor et Haskill, 1992; Reinecker *et al.*, 1993). IL-6 active une voie de signalisation qui implique l'activation du STAT-3 et l'induction des gènes anti-apoptotiques Bcl-2 and Bcl-xl (Atreya *et al.*, 2000). Ainsi, le blocage de la voie de signalisation de l'IL-6 pourrait être considéré comme une nouvelle stratégie thérapeutique pour les maladies inflammatoires de l'intestin.

Chez les patients qui souffrent de maladies inflammatoires de l'intestin, les modifications au niveau de la muqueuse intestinale sont corrélées avec les changements de l'activité de la DAO et/ou du contenu en histamine. Ainsi, des concentrations élevées en histamine et des activités réduites en DAO ont été enregistrées au niveau de la muqueuse intestinale chez des patients atteints de colite ulcéreuse ou maladie de Crohn. Dans ce contexte, une activité réduite de la DAO peut être un indicateur potentiel des dommages survenus à la muqueuse intestinale dans les maladies inflammatoires de l'intestin et les maladies néoplasiques. L'activité de la DAO au niveau de la muqueuse enflammée chez les patients souffrant de colite ulcéreuse est inférieure comparativement au tissu normal (Schmidt *et al.*, 1990). Chez les patients souffrant de la maladie de Crohn, l'activité de la DAO a été corrélée avec

la sévérité des modifications histologiques au niveau de la muqueuse intestinale. Les patients avec des valeurs très basses de la DAO étaient prédisposés à une réapparition de la maladie. Ces observations ont suggéré que des mesures de l'activité de la DAO peuvent être utiles pour prévoir le risque de réapparition de la maladie ou des possibles complications après une résection intestinale (Thompson *et al.*, 1988). Raithel et ses collaborateurs (1995) ont montré que les niveaux d'histamine peuvent rester dans des limites normales, même si l'activité de la DAO était réduite, à cause d'une possible augmentation du catabolisme de l'histamine par la voie de méthylation. Ainsi, l'excrétion urinaire du *N*-méthylhistamine est augmentée chez les patients avec la maladie de Crohn (Winterkamp *et al.*, 2002) et peut aussi représenter un marqueur de l'activité de la maladie.

3.3.3.4 Autres implications physiopathologiques de la diamine oxydase et de la catalase

Il a été montré que l'inhibition de la DAO suivie par l'administration orale de l'histamine peut induire des réactions très sévères (Sattler *et al.*, 1989). Certains patients qui souffrent de migraine présentent une activité réduite de la DAO, ce qui permet une accumulation d'histamine dans l'organisme (Krabbe et Olesen, 1980), et la thérapie avec les anti-histaminiques peut s'avérer efficace. La diminution de l'activité de la DAO pourrait être un marqueur des dommages tissulaires chez les patients avec des problèmes rénaux (Stein *et al.*, 1994) ou hépatiques (Ruan, Gong et Zhang, 2004). Une activité réduite de la DAO a été aussi mesurée chez les patients avec urticaire chronique (Lessoif *et al.*, 1990) ou avec eczéma atopique (Maintz *et al.*, 2006).

Tel que mentionné précédemment, une réponse endogène anti-oxydante insuffisante peut induire l'augmentation de H_2O_2 , de HO^\bullet et de $HClO$ au niveau de la *lamina propria* et de l'épithélium intestinal, ce qui peut contribuer à la pathogénèse des maladies inflammatoires de l'intestin (Kruidenier *et al.*, 2003). L'augmentation

disproportionnée de la SOD par rapport aux niveaux en catalase ou en GSH peroxydase a été associée avec certaines pathologies, tels que le syndrome Down (Brooksbank et Balazs, 1984), l'épilepsie (Singh et Pathak, 1990) ou différents cancers (Picardo *et al.*, 1996). Un déficit en catalase a été déjà rencontré chez l'humain et chez les animaux, et il est représenté par l'acatalasémie et l'hypo-catalasémie. Cette maladie se manifeste au niveau des globules rouges qui sont plus sensibles au stress oxydant. L'approche thérapeutique de l'acatalasémie ou de l'hypo-catalasémie est basée sur l'administration intra-péritonéale de la catalase qui permet la réduction de la quantité de H_2O_2 dans le sang à une concentration sécuritaire (Goth et Eaton, 2000).

Certains facteurs peuvent limiter l'utilisation de l'enzymothérapie: 1) l'activation de la réponse immunitaire contre l'enzyme lorsqu'elle est administrée de façon répétée, 2) l'instabilité de l'enzyme *in vivo* avec une perte partielle ou totale de son activité enzymatique, 3) la non-disponibilité de certaines enzymes sous leur forme pure. Malgré ces limitations, l'administration thérapeutique des enzymes présente encore beaucoup d'intérêt dans l'industrie pharmaceutique surtout pour les maladies qui ne disposent pas d'autres traitements efficaces.

CHAPITRE IV

PRÉSENTATION DU PROJET

Depuis plusieurs années, des macromolécules d'origine naturelle (*polysaccharides*: amidon, alginate, chitosane, pectine; *protéines*: gélatine, albumine, protéines laitières) et des polymères synthétiques (polyvinyl pyrrolidone, polyvinyl alcool) sont utilisées pour des applications pharmaceutiques. L'utilisation de l'amidon comme matière première pour l'élaboration des systèmes de transport et relargage des principes actifs semble très avantageuse, surtout en considérant que le Canada est un producteur important d'amidon. Dans les années '90, l'équipe de recherche du professeur Mateescu (UQAM) a introduit le Contramid[®], une matrice à libération contrôlée des médicaments, à base d'amidon riche en amylose modifié par réticulation (Lenaerts, Dumoulin et Mateescu, 1991; Mateescu, Lenaerts et Dumoulin, 1994). Le Contramid[®] ne présente pas de fonctions ioniques et la libération des médicaments est réalisée par des mécanismes de gonflement de la matrice contrôlés par la présence des liens d'hydrogène. Un amidon hautement réticulé (Liamid[®]) a été aussi proposé comme agent liant et désintégrant (Cartilier *et al.*, 1994; Dumoulin *et al.*, 1994). Des dérivés de l'amidon réticulé ont été proposés comme systèmes pour assurer une libération contrôlée de médicaments à charge élevée (Mulhbacher *et al.*, 2001). Comme il avait déjà montré que la présence des fonctions ioniques sur l'amidon réticulé peut moduler la libération de certains médicaments (Mulhbacher *et al.*, 2001), notre équipe a proposé plus tard le carboxyméthyl amidon non-réticulé (CMA) comme matrice pour le transport et la livraison d'agents bioactifs au niveau du tractus intestinal (Mulhbacher,

Mateescu et Calinescu, 2004; Calinescu *et al.*, 2005). Pour éviter l'utilisation d'agents de réticulation, des interactions directes entre les charges opposées des chaînes polymériques (*i.e.* complexes ioniques) ont été aussi envisagées pour stabiliser les comprimés monolithiques. Le chitosane, un bio-polymère à base de polyglucosamine avec un caractère cationique, présente un grand intérêt pour la réalisation des nouvelles matrices polymériques. Le chitosane a été ainsi associé avec des polyanions naturels comme le carboxyméthyl cellulose, l'alginate, le dextrane sulfaté, le carrageenane, la pectine, le xanthane, le sulfate de chondroïtine ou le hyaluronate (Chapitre I, Section 1.2.2.3). Dans ce contexte, nous avons proposé l'association du chitosane avec le CMA pour la formulation de plusieurs agents bioactifs (*i.e.* bactéries lactiques, enzymes thérapeutiques).

Ce projet de recherche fait partie de l'ensemble des projets du *Laboratoire d'enzymologie et des polymères biocompatibles* (Dr. Mateescu, UQAM) dédiés au développement de formulations pharmaceutiques performantes et à la livraison d'agents prophylactiques et thérapeutiques au niveau de l'intestin grêle ou au côlon. Pour la majorité des agents bioactifs administrés par la voie orale (vaccins, enzymes thérapeutiques, probiotiques), il y a plutôt le besoin que l'agent bioactif soit livré après un certain temps et à un site spécifique que d'être libéré continuellement durant des longues périodes. En conséquence, il y a la nécessité d'avoir des systèmes polymériques qui protègent l'agent bioactif contre l'acidité gastrique et qui le libèrent au niveau intestinal à des endroits bien établis. L'utilisation des comprimés monolithiques à base des dérivés macromoléculaires d'origine naturelle comme systèmes de transport et de livraison d'agents bioactifs est pleinement justifiée par la simplicité du processus technologique représenté par une compression directe des mélanges des poudres, et la possibilité d'administrer une quantité précise d'agent actif à chaque comprimé. Les connaissances acquises dans notre groupe de recherche ouvrent des perspectives pour la formulation d'autres agents bioactifs administrables par voie orale. Dans ce contexte, le présent projet doctoral propose une étude de

formulation pour la livraison d'un vaccin (*fimbriae* F4), d'un probiotique (*Lactobacillus rhamnosus*) et de deux enzymes thérapeutiques (la diamine oxydase, DAO, et la catalase).

Une des nouveautés de ce projet consiste en l'utilisation de l'amidon riche en amylose, non-réticulé et substitué avec des groupements carboxyméthyle (CMA), comme excipient principalement conçu pour transporter des agents bioactifs à travers l'acidité du tractus gastrique et pour libérer rapidement l'agent bioactif à un pH légèrement alcalin. Ce matériau polymérique et son utilisation font l'objet d'une demande de brevet (Mulhbach, Mateescu et Calinescu, 2004). Auparavant, pour obtenir une protection contre la diarrhée post-sevrage au niveau de la muqueuse intestinale chez le porc, des concentrations élevées des *fimbriae* F4, avec une administration préalable de bicarbonate de sodium étaient nécessaires. Dû au fait que ce traitement comporte trop de manipulation avec l'animal, il était difficile à être utilisé à grande échelle. Dans ce contexte, comme il y avait le besoin d'avoir un système de transport pour les *fimbriae*, qui les protège et les libère assez rapidement, nous avons proposé la formulation à base de CMA non-réticulé (comprimés monolithiques) pour l'administration orale de cet agent bioactif chez le porcelet. Ainsi, les *fimbriae* F4 peuvent être libérées dans les conditions intestinales afin d'adhérer à leurs récepteurs spécifiques qui se trouvent dans la première partie de l'intestin.

Une autre nouveauté est l'association du CMA avec le chitosane, en obtenant des matrices de type CMA:Chitosane qui ont été utilisées pour la formulation du probiotique *L. rhamnosus* et des enzymes thérapeutiques, la DAO et la catalase. L'association CMA:Chitosane, stabilisée par des interactions ioniques, pourrait améliorer sensiblement les propriétés du CMA comme transporteur d'agents bioactifs en retardant leur livraison au niveau des sites intestinaux (*i.e.* intestin grêle et/ou côlon). Cette amélioration est due au comportement du CMA et du chitosane qui dépend du pH du milieu. Ainsi, le chitosane est soluble au pH acide en formant des

hydrogels au niveau gastrique, et insoluble au pH alcalin (intestinal), tandis que le CMA (comprimé) est compacté en milieu acide et se solubilise dans un milieu neutre/alcalin. Le comportement différent et complémentaire de ces deux polymères pourrait être capable de moduler et améliorer réciproquement la libération des principes actifs mentionnés. Les agents bioactifs représentés par la DAO et la catalase, seuls ou associés, ont été proposés pour la thérapie enzymatique orale pour le traitement de différentes maladies intestinales. L'originalité des formulations bi-enzymatiques à base de CMA:Chitosane consiste dans l'association de la DAO avec la catalase. Ainsi, la DAO devrait diminuer les quantités d'histamine présentes au niveau intestinal et pourrait avoir certains effets antioxydants. L'association de la catalase à la DAO permettrait l'élimination du H_2O_2 (produit d'oxydation de la DAO en présence d'histamine), en protégeant ainsi la DAO qui est susceptible à la présence de H_2O_2 . En même temps, la catalase pourrait jouer un rôle bénéfique majeur contre le stress oxydatif au niveau intestinal. Ce projet doctoral propose aussi une nouvelle méthode de détection de l'activité enzymatique de la DAO sur des gels de polyacrylamide contenant la peroxydase immobilisée. Cette méthode a été optimisée avec le but d'étudier la stabilité enzymatique de la DAO non-formulée en présence des enzymes digestives (pepsine, pancréatine).

L'objectif à long terme de ce projet a été l'élaboration de nouvelles matrices polymériques pour le transport des agents bioactifs au niveau du tractus gastro-intestinal. Les principaux objectifs pour le projet de thèse ont été les suivants:

1) réaliser des formulations pour l'administration orale de différents agents bioactifs (*fimbriae* F4, *L. rhamnosus*, DAO, catalase) sous forme de comprimés monolithiques ou double-noyau. Les formulations monolithiques sont réalisées par compression directe des mélanges des poudres de l'agent actif avec le CMA et/ou chitosane. Les formulations double-noyau contiennent déjà à l'intérieur un noyau comprimé avec l'agent actif, et ce comprimé est recouvert par CMA, le comprimé final étant obtenu par une deuxième compression.

- 2) identifier la meilleure masse moléculaire de chitosane pour la formulation à base de CMA:Chitosane, qui assure une bonne protection gastrique et un retard adéquat dans la libération du probiotique *L. rhamnosus*;
- 3) utiliser une masse moléculaire de chitosane appropriée pour la formulation d'autres agents bioactifs (comme la DAO et la catalase) avec CMA:Chitosane;
- 4) étudier les mécanismes de libération de ces agents bioactifs;
- 5) réaliser des études de stabilité des agents bioactifs (*fimbriae* F4, DAO, catalase) en présence des enzymes digestives (*i.e.* pepsine, pancréatine);
- 6) mettre au point une formulation bi-enzymatique (DAO:Catalase) pour la thérapie des maladies entériques.

Ces nouvelles formulations bio-pharmaceutiques pourraient constituer des alternatives intéressantes pour la prévention de la diarrhée post-sevrage chez le porcelet (vaccin à base des *fimbriae* F4) et pour la prévention ou la thérapie de différentes maladies entériques comme la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse (probiotiques, DAO:Catalase) ou le cancer intestinal (DAO).

Le projet sur la formulation des *fimbriae* F4 a été réalisé en collaboration avec le groupe de recherche du Dr. John Morris Fairbrother de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal. L'efficacité du CMA comme transporteur des *fimbriae* F4 chez le porcelet a déjà été testée *in vivo* par le groupe de recherche du Dr. Fairbrother et les résultats se sont avérés intéressants. Le projet sur la DAO (les études de stabilité enzymatique et de formulation) a été réalisé en collaboration avec les professeurs Bruno Mondovi (Département des Sciences Biochimiques "Rossi-Fanelli", Université de Rome "La Sapienza", Italie) et Rodolfo Federico (Département de Biologie, Université de Rome 3, Italie). La poudre d'extrait végétal de DAO a été

fournie par le laboratoire du professeur Federico, et la poudre de DAO purifiée, par le groupe du professeur Mondovi. Les résultats sur la formulation des *fimbriae* F4 et du probiotique *L. rhamnosus* et ceux sur la stabilité de la DAO en présence des enzymes digestives constituent la base des trois articles déjà publiés (Calinescu *et al.*, 2007; 2008; 2010). Pour la dernière partie de projet (étude de formulation de la DAO et/ou de la catalase), un article est soumis au *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.

L'ensemble des travaux effectués au doctorat est présenté à la Figure 4.1.

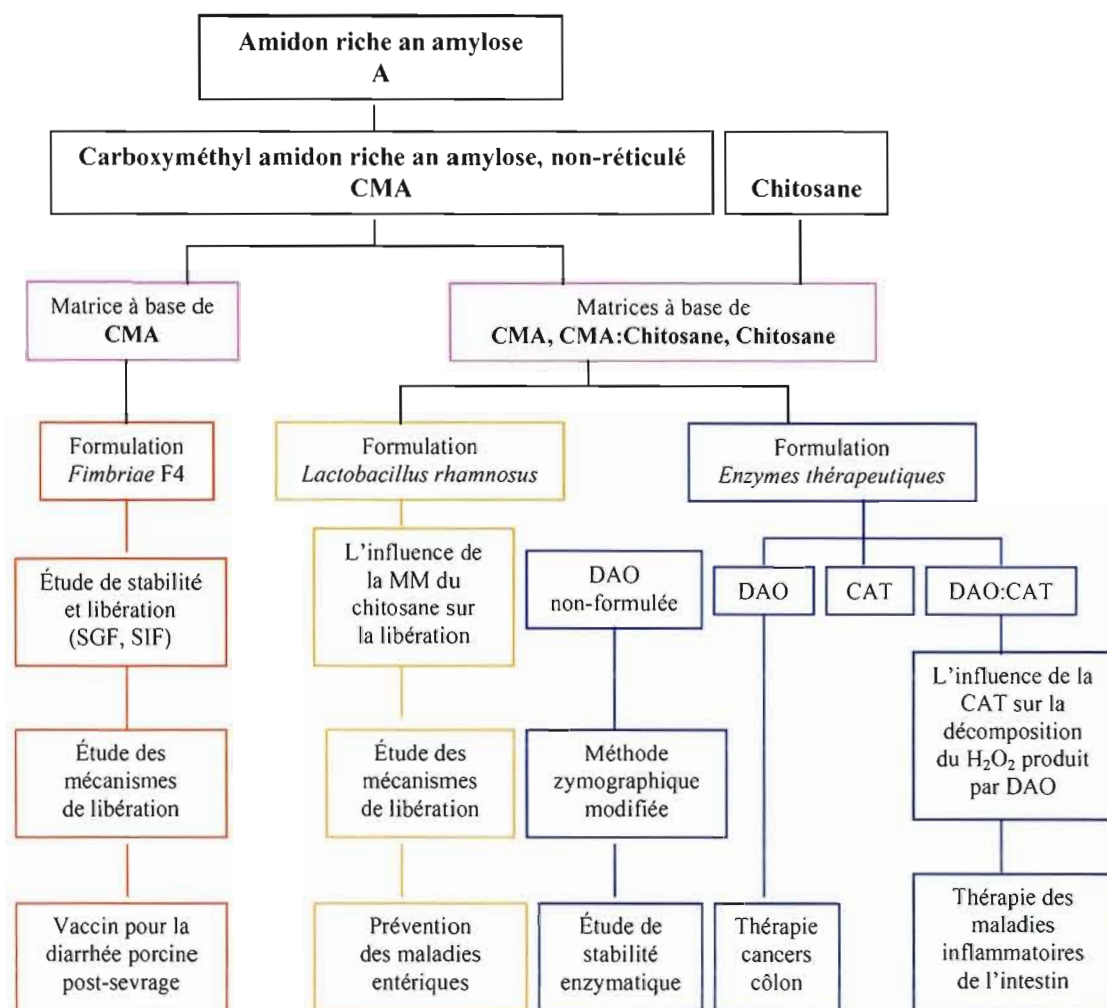


Figure 4.1: Présentation schématique des différentes étapes du projet doctoral.

CAT, catalase; DAO, diamine oxydase; MM, masse moléculaire; SGF, fluide gastrique simulé; SIF, fluide intestinal simulé.

La partie expérimentale de la thèse présente des contributions originales sous forme d'une série de quatre manuscrits. *Le premier manuscrit*, "Carboxymethyl high amylose starch for F4 *fimbriae* gastro-resistant oral formulation", propose le Carboxyméthyl amidon riche en amylose comme excipient pour la protection d'un vaccin oral à base des *fimbriae* F4 contre l'acidité gastrique et la pepsine, permettant leur libération ultérieure dans le fluide intestinal. Nous avons montré que la présence de la pancréatine dans le milieu intestinal n'a pas eu d'effet sur la stabilité structurale des sous-unités majeures des *fimbriae* F4, fait qui est essentiel pour l'induction d'une réponse immunitaire mucoale au niveau de l'intestin. *Le deuxième manuscrit*, "Carboxymethyl high amylose starch: Chitosan self-stabilized matrix for probiotic colon delivery", propose un nouveau système hydrophilique basé sur une auto-stabilisation ionique entre un excipient carboxylé (carboxyméthyl amidon riche en amylose) et un excipient avec des groupes amine (chitosane) pour la livraison de *Lactobacillus rhamnosus* au niveau du côlon. Le comportement différent de ces deux polymères dans les milieux gastro-intestinaux simulés a contribué d'assurer un retard dans le processus de libération intestinale des bactéries, avec une libération dépendante de la masse moléculaire et du pourcentage de chitosane utilisé dans les formulations monolithiques. Un autre agent bioactif utilisé a été représenté par la DAO qui se trouve à la base des deux autres articles de la thèse. Ainsi, *le troisième manuscrit*, "Zymographic assay of plant diamine oxidase on entrapped peroxidase polyacrylamide gel electrophoresis. A study of stability to proteolysis", décrit une méthode zymographique modifiée pour la DAO. Cette méthode a permis d'évaluer la stabilité de la DAO à la protéolyse, en déterminant l'activité enzymatique directement sur des gels électrophorétiques de polyacrylamide contenant la peroxydase immobilisée. Finalement, *le quatrième manuscrit*, "Diamine oxidase and catalase formulation with Carboxymethyl starch : Chitosan excipients for colon delivery", décrit des formulations enzymatiques pour l'administration orale à base de carboxyméthyl amidon riche en amylose et chitosane (comprimés monolithiques), contenant un extrait végétal lyophilisé de *Lathyrus sativus* avec une activité oxydasique (PSDAO), la catalase, ou la

PSDAO associée à la catalase. L'association de ces deux enzymes administrées par voie orale représente une nouveauté pour la thérapie intestinale et fait l'objet d'une demande de brevet. Des études de stabilité gastrique et de libération dans les conditions intestinales sont présentées pour les deux enzymes mentionnées, formulées seules ou en association. L'association de la DAO à la catalase sous forme des comprimés monolithiques à base de Carboxyméthyl amidon : Chitosane pourrait représenter une thérapie alternative pour le traitement des maladies intestinales.

4.1 Contributions à la recherche réalisées durant le doctorat

Articles avec comité de lecture

Calinescu C., Nadeau É., Mulhbach J., Fairbrother J. M. et Mateescu M. A. 2007. «Carboxymethyl high amylose starch for F4 *fimbriae* gastro-resistant oral formulation». *Int. J. Pharm.*, vol. 343, p. 18-25.

Calinescu C. et Mateescu M. A. 2008. «Carboxymethyl high amylose starch: Chitosan self-stabilized matrix for probiotic colon delivery». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 70, p. 582-589.

Calinescu C., Federico R., Mondovi B. et Mateescu M. A. 2010. «Zymographic assay of plant diamine oxidase on entrapped peroxidase polyacrylamide gel electrophoresis. A study of stability to proteolysis». *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 396, p. 1281-1290.

Calinescu C., Mondovi B., Federico R. et Mateescu M. A. 2011. «Carboxymethyl starch:Chitosan monolithic matrices containing diamine oxidase and catalase for intestinal delivery». *Soumis*.

Ispas-Szabo P., De Koninck P., Calinescu C. et Mateescu M. A. 2010. «Novel Carboxymethyl starch excipients for small molecules oral dosage forms». *Article en préparation*.

Delisle B., Calinescu C., Mateescu M. A., Fairbrother J. M. et Nadeau É. 2010. «Oral immunization with F4 *fimbriae* and CpG enhances F4-specific mucosal immune response and induces Th1 and Th2 cytokine modulation in swine». *Article en préparation*.

Brevets

Mateescu M. A., Calinescu C., Ispas-Szabo P., Mondovi B. et Federico R. 2011. «Oral enzyme formulations for intestinal delivery». *Demande de brevet*.

Conférences avec arbitrage (texte intégral ou abrégé publié)

Calinescu C., Masicotte L. P., Mulhbachcr J. et Mateescu M. A. 2005. «Carboxymethyl high amylose starch as excipient affording resistance to gastric acidity for bioactive agents oral formulations». *Transactions of 32nd Annual Meeting of the Controlled Release Society*, Miami Beach, Florida, États-Unis. *Extended abstract* (# 445).

Calinescu C., Mulhbachcr J., Nadeau É., Fairbrother J. M. et Mateescu M. A. 2006. «Carboxymethyl high amylose starch excipient for the F4 *fimbriae* gastro-resistant oral formulation». *Transactions of 33rd Annual Meeting of the Controlled Release Society*, Vienne, Autriche. *Extended abstract* (# 1035).

Calinescu C., Mulhbachcr J., Nadeau É., Fairbrother J. M. et Mateescu M. A. 2006. «Le carboxyméthyl amidon comme excipient pour la formulation et le transport des *fimbriae* F4 au niveau du tractus gastro-intestinal». *Colloque BioMed*, Centre de Recherches Biomédicales, UQAM, Montréal, Québec, Canada. Affiche.

Calinescu C. et Mateescu M. A. 2006. «Polymères biocompatibles comme excipients pour la formulation et le transport des bactéries lactiques au niveau du tractus gastro-intestinal». *74^e Congrès de l'Acfas*, Montréal, Québec, Canada. Présentation orale.

Ispas-Szabo P., Calinescu C. et Mateescu M. A. 2006. «Gastro-resistant oral dosages based on Carboxymethyl high amylose starch». *Transactions of 33rd Annual Meeting of the Controlled Release Society*, Vienne, Autriche. *Extended abstract* (# 843).

Calinescu C. et Mateescu M. A. 2007. «Carboxymethyl high amylose starch – Chitosan tablets affording colon probiotic delivery». *Transactions of 34th Annual Meeting of the Controlled Release Society*, Long Beach, Californie, États-Unis. *Extended abstract* (# 655).

Calinescu C., Nadeau É., Mulhbach J., Fairbrother J. M. et Mateescu M. A. 2007. «Carboxyméthyl amidon comme excipient pour le transport et la libération des bactéries d'*Escherichia coli* et des *fimbriae* F4 au niveau du tractus gastro-intestinal». *1^{er} Symposium du Centre de recherche en infectiologie porcine (CRIP)*, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada. Affiche.

Calinescu C. et Mateescu M. A. 2007. «Polymères biocompatibles pour le transport et la livraison des bactéries lactiques *Lactobacillus rhamnosus* au niveau du tractus gastro-intestinal». *Colloque BioMed*, Centre de Recherches Biomédicales, UQAM, Montréal, Québec, Canada. Affiche.

Ispas-Szabo P., De Koninck P., Calinescu C. et Mateescu M. A. 2007. «Novel Carboxymethyl Starch excipients for oral dosage forms». *Transactions of 34th Annual Meeting of the Controlled Release Society*, Long Beach, Californie, États-Unis. *Extended abstract* (# 724).

Delisle B., Fairbrother J. M., Calinescu C., Mateescu M. A. et Nadeau É. 2007. «Détermination de l'effet des adjuvants CpG et de la toxine cholera sur la réponse immunitaire contre le *fimbriae* F4 administré oralement chez le porc». *1^{er} Symposium*

du Centre de recherche en infectiologie porcine (CRIP), Saint-Hyacinthe, Québec, Canada. Présentation orale.

Calinescu C. et Mateescu M. A. 2008. «Polymères biocompatibles pour le transport et la livraison des bactéries lactiques *Lactobacillus rhamnosus* au niveau du tractus gastro-intestinal». *4^e Colloque international francophone de microbiologie animale*, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada. Affiche.

Calinescu C. et Mateescu M. A. 2009. «Polymères biocompatibles pour le transport et la livraison des bactéries lactiques au niveau du tractus gastro-intestinal». *12^e Conférence annuelle sur la recherche aux cycles supérieurs en chimie et biochimie*, Montréal, Québec, Canada. Affiche.

PARTIE II

PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE V

UTILISATION DU CARBOXYMÉTHYL AMIDON RICHE EN AMYLOSE POUR LA FORMULATION ORALE GASTRO-RÉSISTANTE DES *FIMBRIAE* F4

Carmen Calinescu ^a, Éric Nadeau ^b, Jérôme Mulhbach ^a, John Morris Fairbrother ^b et
Mircea-Alexandru Mateescu ^a

^a *Département de Chimie et Centre BioMed, Université du Québec à Montréal,
C.P. 8888, Succ. A, Montréal (Québec), Canada H3C 3P8*

^b *Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-
Hyacinthe (Québec), Canada J2S 7C6*

Résumé:

Le carboxyméthyl amidon riche en amylose (CM-HAS) a été proposé comme excipient pour la protection d'un vaccin oral à base des *fimbriae* F4 contre l'acidité gastrique et la pepsine, permettant son libération ultérieure dans le fluide intestinal. Ainsi, les *fimbriae* F4 formulées avec CM-HAS sous forme de comprimés ont été plus stables après 2 h d'incubation dans le fluide gastrique simulé (contenant la pepsine) que les *fimbriae* F4 non-protégées qui, dans ces conditions, ont été presque complètement digérées après 120 min. En présence de la pancréatine (contenant alpha-amylase, lipase et protéases) dans les conditions qui simulent le milieu intestinal, les *fimbriae* F4 ont été libérées à partir des comprimés de CM-HAS durant une période de 5 h. La présence de la pancréatine dans le milieu intestinal n'a pas eu d'effet sur la stabilité structurale des sous-unités majeures des *fimbriae* F4. Ainsi, les *fimbriae* F4 formulées avec CM-HAS pourraient retenir leur activité spécifique de liaison aux récepteurs, fait qui est essentiel pour l'induction d'une réponse immunitaire muqueuse au niveau de l'intestin.

International Journal of Pharmaceutics, 2007, vol. 343, p. 18-25.

**Carboxymethyl high amylose starch for F4 *fimbriae*
gastro-resistant oral formulation**

Carmen Calinescu ^a, Éric Nadeau ^b, Jérôme Mulhbach ^a,
John Morris Fairbrother ^b and Mircea-Alexandru Mateescu ^{a*}

^a *Department of Chemistry and Centre Biomed, Université du Québec à Montréal,
C.P. 8888, Succ. A, Montréal (Québec) Canada, H3C 3P8*

^b *Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000,
Saint-Hyacinthe, (Québec) Canada, J2S 7C6*

* Corresponding author

Tel.: +1 514 987 4319

Fax: +1 514 987 4054

E-mail address: mateescu.m-alexandru@uqam.ca

Abstract

The carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) was proposed as excipient able to protect F4 *fimbriae* oral vaccine against gastric acidity and pepsin, allowing its subsequent liberation in the intestinal fluid. Thus, F4 *fimbriae* formulated with CM-HAS as tablets displayed a markedly higher stability after 2 h of incubation in simulated gastric fluid (containing pepsin) than the free, non-protected F4 *fimbriae*, which, in these conditions, were almost completely digested after 120 min. In the presence of pancreatin (with alpha-amylase, lipase, and proteolytic activities) in simulated intestinal conditions, the F4 *fimbriae* were liberated from CM-HAS tablets over a period of up to 5 h. The presence of pancreatin in intestinal medium did not affect the structural stability of the F4 *fimbriae* major subunits. Thus, F4 *fimbriae* formulated with CM-HAS would retain their receptor binding activity essential for the induction of an intestinal mucosal immune response.

Keywords: Carboxymethyl high amylose starch; F4 *fimbriae*; Vaccine; Oral administration; Tablet; Gastro-resistance.

Abbreviations: CM, carboxymethyl; CM-HAS, carboxymethyl high amylose starch (non-cross-linked); DS, degree of substitution; NMR, nuclear magnetic resonance; ETEC, enterotoxigenic *Escherichia coli*; SGF, simulated gastric fluid; SIF, simulated intestinal fluid; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; PBS, phosphate buffer solution; TBS, Tris buffer solution; TTBS, TBS solution containing 0.2% Tween-20; IOD, integrated optic density.

1. Introduction

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is an important cause of disease in mammals, and, in the case of neonatal and recently weaned pigs, is responsible for diarrhea, reduced growth rate and mortality, with subsequent economic losses. ETEC bacteria adhere to the small intestinal epithelium by means of fimbrial adhesins, F4 being the most prevalent type of *fimbriae* in ETEC strains (F4⁺ETEC) causing neonatal and post-weaning diarrhea in pigs (Fairbrother and Gyles, 2006). F4 *fimbriae* are long filamentous polymeric surface proteins, mainly composed of FaeG subunits (fimbrial major subunit) and low amounts of the fimbrial minor subunits FaeC (located at the tip), FaeF and FaeH (situated along the fimbrial structure) and probably FaeI and FaeJ (Bakker et al., 1992a). These *fimbriae* are responsible for bacterial adhesion to F4-specific receptors present on brush borders of villous enterocytes. The binding site of F4 *fimbriae* is situated on the FaeG major subunit (Bakker et al., 1992b), permitting F4⁺ETEC bacteria to withstand expulsion by intestinal peristalsis and to colonize the small intestine (Jones and Rutter, 1972). These bacteria produce enterotoxins which act on enterocytes, resulting in aqueous diarrhea (Nataro and Kaper, 1998). A prerequisite for ETEC infection is the presence of F4 receptors, piglets without this type of receptor being resistant to infection (Van den Broeck et al., 1999a).

One approach for the prevention of post-weaning diarrhea in pigs due to F4⁺ETEC would be oral vaccination with an F4 vaccine. Orally administered, purified F4 *fimbriae* were found to induce an intestinal mucosal immune response in F4 receptor-positive (F4R⁺) piglets (Van den Broeck et al., 1999a,b). This *in situ* mucosal immune response is not observed following parenteral immunization which activates the systemic immune system (Bianchi et al., 1996). Thus, purified F4 *fimbriae* can be considered as a suitable component of an oral vaccine for the blocking of subsequent adhesion of F4⁺ETEC.

Oral administration of F4 *fimbriae* in suspension is not cost-effective because of possible fimbrial denaturation by acids, bile and enzymes present in the gastro-intestinal tract (Snoeck et al., 2004). Oral administration of a solid formulation of the F4 *fimbriae* may result in a more effective vaccine, due to protection of the F4 *fimbriae* from the gastric pH and digestion by pepsin in the stomach. The purpose of F4 formulation with polymeric excipients would be to confer such a protection and, consequently, to decrease vaccine dose and dosing frequency. Delivery of F4 *fimbriae* to a specific absorption window rather than slow release throughout their passage in the gastro-intestinal tract is also a desirable outcome. As the F4 *fimbriae* each consist of many hundreds of identical monomer subunits, it is important that they be formulated with an appropriate polymeric matrix type that would also permit their liberation. Some F4 *fimbriae* multi-particulate formulations have been reported (Snoeck et al., 2003; Huyghebaert et al., 2005). To ensure gastro-resistance, these pellets were enteric-coated with Eudragit® (an anionic polymethacrylic acid), an additional step which complicates the manufacturing process. In addition, the release of F4 *fimbriae* from these enteric-coated pellets was not optimal because of subsequent interactions between the F4 *fimbriae* and the coating polymeric material (Huyghebaert et al., 2005). Consequently, there is a need for simple formulations of F4 *fimbriae*, possibly eliminating the coating process.

Starch is an attractive, cost-effective, safe (biocompatible), and renewable material. It is composed of amylose, a non-branched polymer of glucopyranose units with α -D-(1,4) glucosidic bonds, and of amylopectin, a branched polymer with α -D-(1,4) glucosidic bonds, having periodic branches at the O-6 position (Pazur, 1965). Native starch characteristics can be substantially changed by physical modification (i.e. gelatinization) (Svensson and Eliasson, 1995) or by chemical (Fang et al., 2004) or enzymatic (Rajan et al., 2006) alteration, leading to the acquisition of interesting properties as excipients for drug delivery systems (Dumoulin et al., 1999; Mulhbachter et al., 2001). Previous studies have shown the important role of hydroxylic groups in

the organization of the cross-linked high amylose starch matrices (Mateescu et al., 1994; Dumoulin et al., 1998; Ispas-Szabo et al., 2000). In addition, we have shown that the presence of carboxymethyl groups (CM-) can also ensure a good stability of non-cross-linked starch matrices (Calinescu et al., 2005). Starch carboxymethylation results in water-soluble derivatives whose properties are mainly determined by the total degree of substitution. Due to the presence of carboxylic functional groups, the swelling properties of carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) are influenced by the environmental pH (Mulhbacher et al., 2004). In an acidic simulated gastric fluid (SGF), the CM-HAS matrix will become protonated, thus ensuring gastro-resistance of bioactive agents to acidic/enzymatic media. In neutral or weak alkaline simulated intestinal fluid (SIF), the protonated form will exchange the protons for cations, facilitating the hydration and dissolution of the polymeric matrix with the gradual release of the bioactive agent. Matrices (e.g. tablet form) based on CM-HAS may represent a viable solution for the transport of bioactive agents in the gastro-intestinal tract. This excipient has already been successfully used *in vitro* for the gastric protection and delivery of large size bioactive agents such as *Escherichia coli* microorganisms (Calinescu et al., 2005).

The aim of this study is to evaluate whether a matrix (tablet) based on CM-HAS as excipient can also confer gastric protection and permit intestinal delivery of bioactive agents smaller in size, such as peptide aggregates.

2. Materials and methods

2.1. Materials

High amylose corn starch (Hylon VII) was obtained from National Starch (NJ, USA); pepsin A from porcine gastric mucosa (Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO, USA); pancreatin (porcine pancreas) eight times strength (with alpha-amylase,

lipase and proteolytic activities) from A&C American Chemicals Ltd (Montreal, Quebec, Canada); acrylamide, *N,N'*-methylene-bis-acrylamide, protein molecular weight markers (broad range) from Bio-Rad Laboratories (Richmond, VA, USA); Western blotting membranes and ECLTM (enzymatic chemiluminescence) reagents from Amersham Pharmacia Biotech (NJ, USA); hyperfilmTM, X-ray film cassettes, electrophoresis (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratory) and Western blotting (W.E.P. Company, Seattle, WA, USA) systems.

Anti-F4 IgY primary antibody was produced by the Reference Laboratory for *Escherichia coli* (Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada); horseradish peroxidase-labelled anti-IgY secondary antibody was obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, PA, USA).

Purified, freeze-dried F4 *fimbriae* were produced by the Reference Laboratory for *Escherichia coli* (Saint-Hyacinthe). The purity of the F4 *fimbriae* was assessed by electrophoresis on 12 % sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using the Bio-Rad Mini-Protean II electrophoresis system.

The derivatization agent (monochloroacetic acid) and the other chemicals were all reagent grade and used without further purification.

2.2. Synthesis of CM-HAS polymeric material

The CM-HAS was synthesized by etherification of the starch with monochloroacetic acid in an alkaline reaction medium, as described previously by Schell et al. (1978), Mulhbachter et al. (2001) and Calinescu et al. (2005), with slight modifications.

An amount of 70 g of high amylose starch (Hylon VII) was suspended in 170 mL of distilled water and warmed at 50 °C under continuous stirring in a Hobart planetary mixer. In order to obtain a better etherification, a volume of 235 mL of an aqueous 1.45 M NaOH solution was added and the reaction medium was homogenized for 20 min at 50 °C for gelatinization. Subsequently, 55 mL of 10 M NaOH solution were added to the reactional medium to activate the starch, transforming it into a more reactive alkoxide form and favoring the nucleophilic substitution for carboxymethylation. Then, 45.5 g of monochloroacetic acid (dissolved in a minimum volume of water) were added and the starch was allowed to react (1 h at 50 °C) with monochloroacetic acid under continuous stirring. At the end of reaction, the gel-slurry was neutralized with an acetic acid solution and acetone was slowly added to the neutralized suspension. Washing with acetone:water (60:40, v/v) of polymeric derivative was done as previously described (Calinescu et al., 2005). After repeating the filtration and resuspension operations, the CM-HAS gel-slurry was dried with pure acetone, held overnight to air at room temperature, ground in a blender, and then sieved to obtain a powder with particles granulometrically smaller than 300 μm . This powder was used to prepare the tablets. The residual moisture of the polymer powder was calculated based on the product weight loss after the drying of the powder (100 °C).

2.3. Determination of CM-HAS substitution degree

The presence of carboxylic groups was first assessed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). FTIR spectral analysis of the CM-HAS powder was carried out in potassium bromide (KBr) pellets, using a BOMEM (Hartmann & Braun) spectrometer (MB-series, Quebec, Canada). Spectra were collected at a resolution of 4 cm^{-1} at 25 °C. The degree of substitution of the CM-HAS was determined by direct titration with sodium hydroxide and by ^1H nuclear magnetic resonance (NMR).

2.3.1 Direct titration

The carboxymethyl groups of the CM-HAS were first activated by conversion into the acidic (protonated) form by treatment of the polymer with a 1 M HCl solution. The protonated CM-HAS was then precipitated with acetone, filtered, washed with acetone and finally dried in oven (50 °C). The protonated powder of CM-HAS was dispersed in water and the carboxyl groups were titrated with a 0.1 N NaOH solution.

2.3.2 ^1H -NMR measurements

In order to determine the CM-HAS functionalization pattern, NMR analysis was performed on CM-HAS samples that had been previously hydrolyzed with perchloric acid as described by Heinze et al. (1999). Briefly, 0.1 g of CM-HAS were dispersed in 1 mL HClO_4 (70 %) and after 10 min (room temperature), 9 ml of distilled water were added. The sample was heated at 100 °C for 16 h, and then neutralized with 2 M KOH and kept overnight at 4 °C to allow complete precipitation of KClO_4 . The obtained solution was frozen and freeze-dried. The ^1H NMR analysis was carried out in deuterated dimethyl- d_6 sulphoxide (99.9 atom %D, CDN Isotopes, Quebec, Canada) at 90 °C. The NMR spectra were acquired on a 300 MHz Gemini-300 spectrometer (frequency of proton).

2.4. Tablet formulation of purified F4 fimbriae with CM-HAS

The tablets were produced by direct compression (Carver press) of mixed dry powders (CM-HAS and F4 fimbriae) at a compression force of 2.5 T/cm². Thus, 7 mg of lyophilized powder of fimbriae (containing 2 mg of purified F4 fimbriae) were incorporated into CM-HAS tablets (total mass: 200 mg).

2.5. Stability of *F4 fimbriae* in simulated gastric fluid

Samples of free, lyophilized *F4 fimbriae* (7 mg of powder containing 2 mg of purified *F4 fimbriae*) were individually incubated in 30 mL of SGF (pH 1.2) containing 0.32 % pepsin, 1.17 U/mg (USP, 1990) for 30, 60, 90 and 120 min under gentle rotation at 50 rpm and 37 °C (simulating the gastric passage). At the end of incubation, the pH of each sample was increased to 7.5 ± 0.1 by addition of 240 μ L of 10 M NaOH and 19.76 mL of phosphate buffer solution (PBS), pH 7.4 (total volume: 50 mL) and the stability of the *F4 fimbriae* in SGF was checked. For the CM-HAS formulated *F4 fimbriae*, the tablets were incubated for a duration up to 120 min in the same SGF conditions. Tablets were then transferred in 50 mL of PBS solution (pH 7.4), crushed, and dissolved for 4 h in this solution (under gentle agitation at 4 °C). After each period of incubation indicated above, the *F4 fimbriae* integrity was evaluated by SDS-PAGE (12 %) followed by Western blotting analysis (Sections 2.8 and 2.9).

2.6. Delivery of formulated *F4 fimbriae* in simulated intestinal fluid

The CM-HAS formulated *fimbriae* were incubated for 1 h in 50 mL SGF containing 0.32% pepsin (pH 1.2) and then for 5 h in 50 mL of SIF (pH 7.5 ± 0.1), with or without pancreatin (USP, 1990), at 50 rpm and 37 °C. After every hour of SIF incubation, liberated *F4 fimbriae* were evaluated by SDS-PAGE for pancreatin-free SIF samples (Section 2.8) and by SDS-PAGE followed by Western blotting analysis for SIF samples containing pancreatin (Sections 2.8 and 2.9).

2.7. Free *F4 fimbriae* stability in simulated intestinal fluid

Unformulated (free) lyophilized *F4 fimbriae* (7 mg preparation containing 2 mg of purified *fimbriae*) were incubated for 5 h in 50 mL of SIF containing pancreatin, pH 7.5 ± 0.1 (USP, 1990) at 37 °C and 50 rpm. The *F4 fimbriae* stability in SIF was then

evaluated hourly by SDS-PAGE (12%) followed by Western blotting analysis (Sections 2.8 and 2.9).

For free F4 *fimbriae* controls, 7 mg of lyophilized F4 powder (2 mg purified F4) were dissolved in 50 mL PBS solution (pH 7.4). In the case of F4 formulated with CM-HAS (control), the tablets were crushed in 50 mL PBS solution (pH 7.4) and then kept 4 h under agitation at 4 °C for CM-HAS complete dissolution.

2.8. Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis

Degradation of F4 *fimbriae* was evaluated using SDS-PAGE. For each of the previously described experiments, 10 µL of F4 fimbrial sample was treated (1:1, v/v) with electrophoresis loading buffer (0.12 M Tris-HCl pH 6.8, 4 % SDS, 20 % glycerol, 10% β-mercaptoethanol and 0.004 % bromophenol blue) and boiled for 2 min. A volume of 10 µL of treated F4 sample was loaded onto a 12 % polyacrylamide gel prepared by the method of Laemmli (1970) and run at room temperature for 1 h (120 V) using an electrophoresis buffer (0.025 M Tris-Base pH 8.3 containing 0.192 M glycine and 0.1% SDS). Molecular weight protein markers (Broad Range, Bio-Rad Laboratories), containing bromophenol blue, were loaded on each electrophoresis gel. Proteins were stained with R-250 Coomassie blue.

2.9. Western blotting analysis

After SDS-PAGE migration, gels were separately equilibrated for 5 min in a transfer buffer (0.025 M Tris-Base, 0.192 M glycine and 20% methanol, pH 8.1-8.4) under gentle agitation. The gels were then blotted onto activated 0.45 µm polyvinylidene fluoride membranes by semi-dry transfer (1.25 h, 80 mA/gel). After the protein transfer process, the non-specific sites on the membrane were blocked

(overnight, 4 °C, under gentle agitation) using 2.5% low fat dried milk dissolved in a Tris buffer solution (TBS: 0.015 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.5). Membranes were then washed once with TBS solution containing 0.2% Tween-20 (TTBS) and once with TBS solution only. For detection of F4 *fimbriae*, membranes were incubated for 2 h (under agitation, at room temperature) in the 2.5% low fat milk TBS solution containing anti-F4 IgY primary antibody (dilution 1:700). Then, membranes were incubated for 1 h in a TBS solution containing horseradish peroxidase-labelled anti-IgY secondary antibody (dilution 1:3500) in the same conditions as above. Between and after the two antibody incubation steps, membranes were washed first in TTBS and then in TBS, both for 5 min. The F4 *fimbriae*-antibody complexes were detected using an enzymatic chemiluminescence test (ECLTM) based on the oxidation of luminol by the horseradish peroxidase. The light produced by this chemiluminescent reaction was detected by a short exposure to a light-sensitive film, which was developed using an automated developer.

Densitometry analysis of bands was carried out using the Alpha Ease FCTM program (ChemilmagerTM 5500). For each band on the film, the program evaluated its surface (mm²) that was multiplied by its corresponding measured density, thus obtaining the integrated optic density (IOD). We determined the percentage of variation of band densities for every sample versus the standard, considering the standard (free or formulated F4 *fimbriae* in PBS, time zero) as 100 %.

2.10. Water uptake and erosion of CM-HAS tablets

The water uptake and erosion of the CM-HAS matrices were determined under conditions similar to those described for the F4 *fimbriae* release study. Tracer-free CM-HAS weighed tablets (polymer only) were placed in flat-bottom dissolution vessels containing SGF medium (37 °C and 50 rpm). After 1 h in SGF, the CM-HAS

tablets were transferred to 50 mL SIF medium with or without pancreatin (at 37 °C and 50 rpm). After each hour of incubation in SIF (with or without pancreatin), hydrated tablets were removed from the dissolution medium, blotted with tissue paper to eliminate the excess surface water, then weighed and placed for drying in an oven at 50 °C. The remaining dry weight was determined until constant mass. Three different tablets were used for each time point ($n=3$).

The percentage of water uptake, erosion and water in remaining tablet were determined gravimetrically and calculated according to Freichel and Lippold (2000), Kavanagh and Corrigan (2004) and Sungthongjeen et al. (2004):

$$\% \text{ Water uptake} = (W_{w(t)} - W_0) / W_0 \times 100$$

$$\% \text{ Erosion} = (W_0 - W_{d(t)}) / W_0 \times 100$$

$$\% \text{ Water in remaining tablet} = (W_{w(t)} - W_{d(t)}) / W_{d(t)} \times 100$$

where $W_{w(t)}$ is the weight of the wet tablet at time t , W_0 the initial dry weight of the tablet and $W_{d(t)}$ is the remaining dry weight of the tablet at time t .

2.11. Statistical analysis

One-way Anova pair-wise comparisons test followed by Tukey honestly significantly difference (HSD) test were used. Statistical significance was assessed at $P \leq 0.01$.

3. Results and discussion

The CM-HAS properties are mainly related to the degree of substitution (DS), which is the average number of CM- groups bound per anhydroglucose unit with maximal (theoretical) DS=3. In the present study, the total DS of the CM-HAS excipient was determined by two methods giving similar values: direct titration (DS 0.33) and ^1H NMR spectroscopy on a hydrolyzed CM-HAS (DS 0.38) (Table 1). ^1H NMR spectroscopy of a hydrolytically depolymerized sample of CM-HAS can also provide information on the partial substitution at the 2, 3 and 6 position of the repeating glucose unit and can be used for the direct quantitative evaluation of the DS. Our NMR analysis showed that a significantly preferred reaction occurred at O-2 in CM-HAS and that starch carboxymethylation proceeded in the order O-2 > O-6 > O-3 (Table 1), confirming the findings of Heinze et al. (2001) and Lazik et al. (2002). The assignments of peaks (Fig. 1) and the calculation of partial DS were carried out according to Lazik et al. (2002).

The residual moisture of the CM-HAS polymer powder was 11%, a value compatible with that of many starch derivatives. The FTIR spectroscopy in KBr yielded signals at 1607 and 1417 cm^{-1} specific for a carboxylate salt ($-\text{COONa}$), confirming the presence of CM- functions on the high amylose starch (data not shown).

Purified F4 *fimbriae* have polymeric structures mainly composed of FaeG subunits. A prerequisite for the induction of an intestinal mucosal immune response is the preservation of the proper FaeG conformation or at least of its binding site to ensure the adherence of F4 *fimbriae* on the villous enterocytes in the small intestine. In our study, since the SDS-PAGE was performed with previously boiled F4 fimbrial samples, and because of the effect of SDS, only the FaeG monomeric major subunit degradation could be observed. These free FaeG monomeric major fimbrial subunits were partially degraded after 30–90 min of incubation in SGF containing pepsin (with

proteolytic activity at pH 1.2) and almost completely digested after 120 min of treatment (Fig. 2a).

Gastric resistance of F4 *fimbriae* is also a prerequisite for its antigenicity. Since free F4 *fimbriae* are destroyed by pepsin, the amount and/or integrity of antigen reaching the mucosal inductive sites could be reduced. When formulated with CM-HAS as tablets, the F4 *fimbriae* did not change markedly in their conformation since they were still recognized by their specific anti-F4 IgY antibodies. Additionally, SDS-PAGE and Western blotting tests showed that the CM-HAS polymeric matrix protected the *fimbriae* against gastric acid treatment and enzymatic denaturation (Fig. 2a,b), more than 90 % of *fimbriae* being protected after 120 min of SGF treatment. This is a good protection efficacy when compared with that of the non-protected *fimbriae* (Fig. 2c). In this context, it is worth mentioning that is not necessary to apply an enteric coating on the CM-HAS matrix for a supplementary protection of the F4 *fimbriae*. The carboxylic groups are known for their ability to buffer and to create strong hydrogen bonds, ensuring thus a compact structure of the tablets in acidic conditions.

The delivery of the formulated F4 *fimbriae* was first observed after 2 h of treatment in pancreatin-free SIF (50 rpm, 37 °C) and continued for up to a further 3 h in the same SIF conditions (Fig. 3). In the presence of pancreatin (with alpha-amylase, lipase and proteolytic activities), the F4 *fimbriae* were liberated more rapidly (Fig. 4a-c). In order to understand the release mechanisms of formulated *fimbriae*, water uptake and erosion of CM-HAS matrices (containing the polymer only) were evaluated. It is known that starch gelatinization and derivatization generate a loss of crystalline order of starch grains (Dumoulin et al., 1998; Ispas-Szabo et al., 2000). Because of this loss of cristallinity, the water will enter more easily into the CM-HAS polymeric tablet. Thus, the contact of the non-cross-linked CM-HAS matrix with the dissolution medium results in hydration of the system. As the carboxymethylation process results in a

water-soluble starch, hydration and dissolution of the matrix can occur at the same time as the erosion. The percentage of CM-HAS matrix water uptake and of erosion as a function of time, in the presence and absence of the pancreatin, are presented in Fig. 5. Initially, an increase in water uptake was observed during the first hour of SIF treatment, followed by a decrease of water uptake after 2 h of treatment (Fig. 5a). This could be due to dissolution and erosion (Fig. 5b) of the polymeric matrices. The presence of pancreatin (with alpha-amylase enzymatic activity) in SIF significantly increased the degradation rate of the modified starch compared with that in SIF in the absence of pancreatin, when the erosion rate of the matrix was lower (Fig. 5b). The fact that CM-HAS can act, within certain limits, as an alpha-amylase substrate is important since the delivery can be modulated by duodenal alpha-amylase. This behavior differentiates CM-HAS from other excipients (i.e. CM-cellulose). Therefore, due to erosion of polymeric matrix in the presence of pancreatin, the F4 *fimbriae* are liberated faster than in the SIF medium in the absence of pancreatin. Fig. 5c shows the water regain normalized as a percentage of water remaining in the CM-HAS tablets in function of time, with and without pancreatin. This normalization is required, considering the tablet erosion. In both cases, the plateau corresponds to the real time water content (%), taking into account the loss of tablet mass due to erosion. The hydration is very fast in the first hour (SIF), but after 2–3 h, the erosion became determinant, explaining the apparent decrease of water uptake (Fig. 5a) and plateau after normalization (Fig. 5c). At this stage, the water uptake by the tablet was accompanied by a water loss and matrix dissolution and erosion, keeping the water percentage in the remaining tablets constant. The CM-HAS matrices underwent hydration, dissolution and bio-erosion at the same time, thus explaining the negative values obtained at 4–5 h in the study of CM-HAS water uptake (Fig. 5a) in the presence of pancreatin.

It was found that the presence of pancreatin in SIF does not affect the structural stability of the F4 *fimbriae* major subunits after 4–5 h of SIF treatment as shown by

SDS-PAGE (Fig. 6a) and Western blotting (Fig. 6b). Statistical analysis using a one-way Anova pair-wise comparisons test followed by a Tukey HSD test showed that there were not statistically significant differences in terms of IOD between F4 *fimbriae* incubations at time 0 and after 4 and 5 h of treatment in SIF medium containing pancreatin (Fig. 6c). Therefore, the formulated *fimbriae*, once liberated in SIF, would retain their antigenicity and their receptor binding activity which are essential for the induction of an intestinal mucosal immune response. We will test the effect of this F4 formulation on the ability of orally administered F4 *fimbriae* on the induction of a localized mucosal specific IgM and IgA antibody response in the jejunum and ileum of weaned pigs, which are the sites where most F4-positive ETEC colonization and induction of the physiological changes of diarrhea occur.

In conclusion, the CM-HAS hydrophilic polymer protected the F4 *fimbriae* against degradation by pepsin and conferred to the tablet formulation an appropriate combination of hydration, dissolution and erosion mechanisms allowing the delivery of a functional bioactive agent. The protection of F4 *fimbriae* by the CM-HAS biodegradable matrix could result in a more effective piglet vaccination than for the free F4 *fimbriae*, possibly due to a higher F4 antigen load in the jejunum of the pig. Further *in vivo* studies on piglets will give more answers on the conditions in which these formulations can protect the immunization capacity of F4 *fimbriae*.

Acknowledgements

This project was funded by Valorisation Recherche Québec (VRQ). The graduate studentship from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and FQRNT (Government of Québec, Canada) awarded to Carmen Calinescu are gratefully acknowledged. Thanks are due to Dr Wilms E. Baille for helpful discussions on the NMR study.

References

- Bakker, D., Willemsen, P.T.J., Willems, R.H., Huisman, T.T., Mooi, F.R., Oudega, B., Stegehuis, F., Graaf, F.K., 1992a. Identification of minor fimbrial subunits involved in biosynthesis of K88 *fimbriae*. J. Bacteriol. 174, 6350-6358.
- Bakker, D., Willemsen, P.T.J., Simons, L.H., van Zijderveld, F.G., de Graaf, F.K., 1992b. Characterization of the antigenic and adhesive properties of FaeG, the major subunit of K88 *fimbriae*. Mol. Microbiol. 6, 247-255.
- Bianchi, A.T., Scholten, J.W., van Zijderveld, A.M., van Zijderveld, F.G., Bokhout, B.A., 1996. Parenteral vaccination of mice and piglets with F4⁺ *Escherichia coli* suppresses the enteric anti-F4 response upon oral infection. Vaccine 14, 199-206.
- Calinescu, C., Mulhbachter, J., Nadeau, E., Fairbrother, J.M., Mateescu, M.A., 2005. Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipient for *Escherichia coli* oral formulations. Eur. J. Pharm. Biopharm. 60, 53-60.
- Dumoulin, Y., Alex, S., Szabo, P., Cartilier, L., Mateescu, M.A., 1998. Cross-linked amylose as matrix for drug controlled release. X-ray and FT-IR structural analysis. Carbohydr. Polym. 37, 361-370.
- Dumoulin, Y., Cartilier, L.H., Mateescu, M.A., 1999. Cross-linked amylose tablets containing α -amylase: an enzymatically-controlled drug release system. J. Control. Rel. 60, 161-167.
- Fairbrother, J.M., Gyles, C.L., 2006. *Escherichia coli* infections. In: Straw, B.E., D'Allaire, S., Zimmerman, J.E., Taylor, D.J. (Eds.), Disease of swine, vol. 38. Iowa State University Press, Ames, pp. 639-674.
- Fang, J.M., Fowler, P.A., Sayers, C., Williams, P.A., 2004. The chemical modification of a range of starches under aqueous reaction conditions. Carbohydr. Polym. 55, 283-289.
- Freichel, O.L., Lippold, B.C., 2000. A new oral erosion controlled drug delivery system with a late burst in the release profile. Eur. J. Pharm. Biopharm. 50, 345-351.
- Heinze, Th., Pfeiffer, K., Liebert, T., Heinze, U., 1999. Effective approaches for estimating the functionalization pattern of carboxymethyl starch of different origin. Starch/Stärke 51, S. 11-16.
- Heinze, Th., Pfeiffer, K., Lazik, W., 2001. Starch derivatives with high degree of functionalization. III. Influence of reaction conditions and starting materials on molecular structure of carboxymethyl starch. J. Appl. Polym. Sci. 81, 2036-2044.

- Huyghebaert, N., Snoeck, V., Vermeire, A., Cox, E., Goddeeris, B.M., Remon, J.P., 2005. Development of an enteric-coated pellet formulation of F4 *fimbriae* for oral vaccination of suckling piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. Eur. J. Pharm. Biopharm. 59, 273-281.
- Ispas-Szabo, P., Ravenelle, F., Hassan, I., Preda, M., Mateescu, M.A., 2000. Structure-properties relationship in cross-linked high-amylose starch for use in controlled drug release. Carbohydr. Res. 323, 163-175.
- Jones, G.W., Rutter, J.M., 1972. Role of the K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by *Escherichia coli* in piglets. Infect. Immun. 6, 918-927.
- Kavanagh, N., Corrigan, O.I., 2004. Swelling and erosion properties of hydroxypropylmethyl cellulose (Hypromellose) matrices—influence of agitation rate and dissolution medium composition. Int. J. Pharm. 279, 141-152.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- Lazik, W., Heinze, Th., Pfeiffer, K., Albrecht, G., Mischnick, P., 2002. Starch derivatives of a high degree of functionalization. VI. Multistep carboxymethylation. J. Appl. Polym. Sci. 86, 743-752.
- Mateescu, M.A., Lenaerts, V., Dumoulin, Y., 1994. Cross-linked material for controlled release of biologically active compounds. Canadian Patent 2,041,774.
- Mulhbacher, J., Ispas-Szabo, P., Lenaerts, V., Mateescu, M.A., 2001. Cross-linked high amylose starch derivatives as matrices for controlled release of high drug loadings. J. Control. Rel. 76, 51-58.
- Mulhbacher, J., Ispas-Szabo, P., Mateescu, M.A., 2004. Cross-linked high amylose starch derivatives for drug release. II. Swelling properties and mechanistic study. Int. J. Pharm. 278, 231-238.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11, 142-201.
- Pazur, J.H., 1965. Enzymes in synthesis and hydrolysis of starch. In: Whistler, R.L. and Paschall, E.F. (Eds.), Starch: chemistry and technology, vol. I. New York/London, Academic Press, pp. 133-175.
- Rajan, A., Prasad, V.S., Abraham, T.E., 2006. Enzymatic esterification of starch using recovered coconut oil. Int. J. Biol. Macromolec. 39, 265-272.

Schell, H.D., Serban, M., Mateescu, M.A., Bentia, T., 1978. Acid and basic amylose ionic exchangers. *Rev. Roumaine Chim.* 23, 1143-1147.

Snoeck, V., Huyghebaert, N., Cox, E., Vermeire, A., Vancaeneghem S., Remon, J.P., Goddeeris, B.M., 2003. Enteric-coated pellets of F4 *fimbriae* for oral vaccination of suckling piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 96, 219-227.

Snoeck, V., Cox, E., Verdonck, F., Joensuu, J.J., Goddeeris, B.M., 2004. Influence of porcine intestinal pH and gastric digestion on antigenicity of F4 *fimbriae* for oral immunisation. *Vet. Microbiol.* 98, 45-53.

Sungthongjeen, S., Puttipatkhachorn, S., Paeratakul, O., Dashevsky, A., Bodmeier, R., 2004. Development of pulsatile release tablets with swelling and rupturable layers. *J. Control. Rel.* 95, 147-159.

Svensson, E., Eliasson, A.C., 1995. Crystalline changes in native wheat and potato starches at intermediate water levels during gelatinization. *Carbohydr. Polym.* 26, 171-176.

US Pharmacopeia XXII, 1990. US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, pp. 1788-1789.

Van den Broeck, W., Cox, E., Goddeeris, B.M., 1999a. Receptor-dependent immune responses in pigs after oral immunization with F4 *fimbriae*. *Infect. Immun.* 67, 520-526.

Van den Broeck, W., Cox, E., Goddeeris, B.M., 1999b. Induction of immune responses in pigs following oral administration of purified F4 *fimbriae*. *Vaccine* 17, 2020-2029.

Table 1

Determination of the degree of substitution of non-cross-linked CM-HAS excipient

| Method | DS _{CM} | x_2 | x_3 | x_6 |
|---------------------------------|------------------|-------|-------|-------|
| ¹ H NMR ^a | 0.38 | 0.2 | 0.076 | 0.111 |
| Direct titration | 0.33 | - | - | - |

x_2, x_3, x_6 = positions 2, 3, 6 of the glucose repeating unit

^a Functionalization pattern of CM-HAS determined by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy after hydrolytic chain degradation.

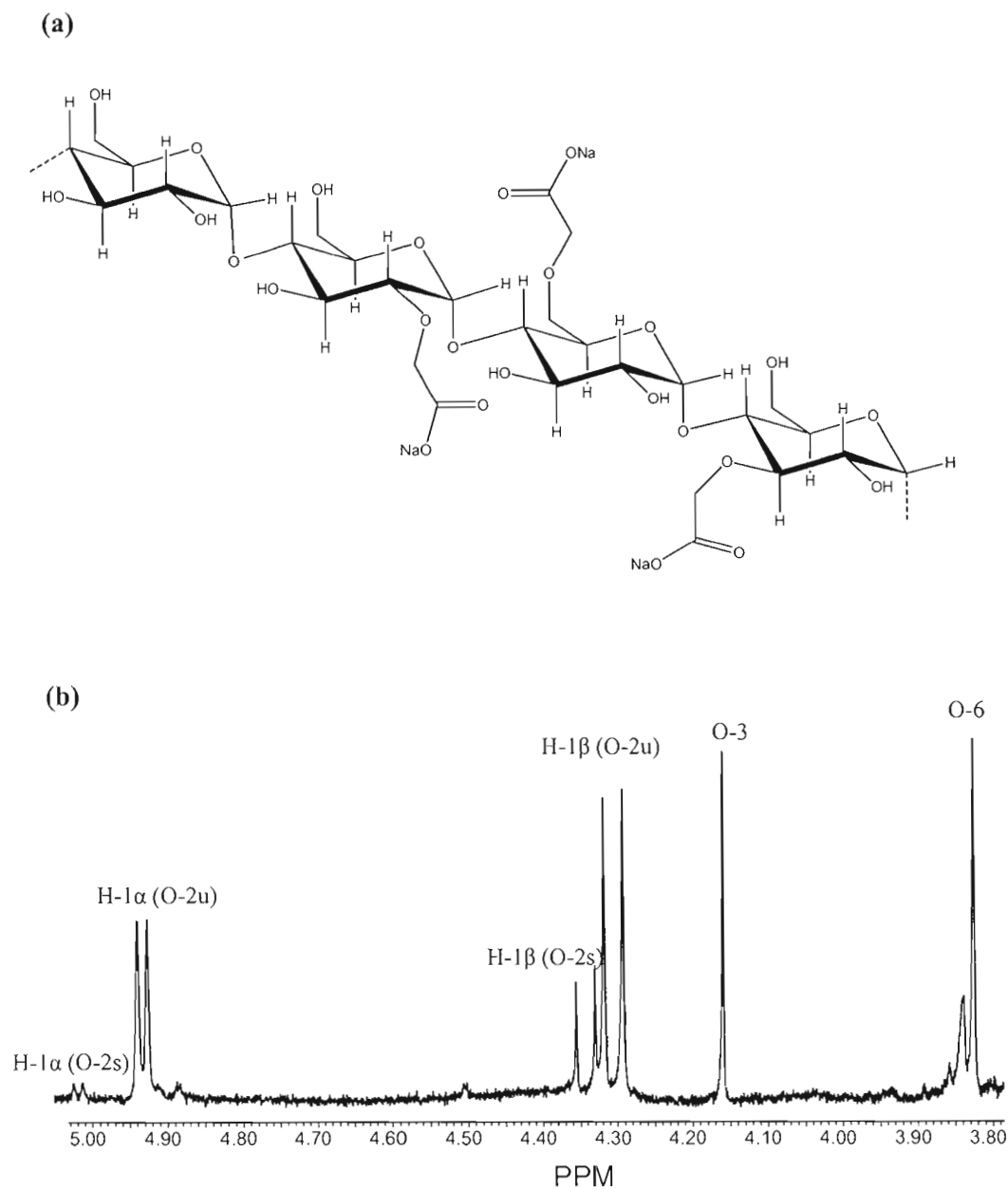


Fig. 1. ^1H NMR spectrum of CM-HAS after hydrolytic chain degradation. Schematic presentation of CM-HAS (a) and ^1H nuclear magnetic resonance spectrum (b). O is the oxygen atom at position i ($i = 2, 3$, or 6), H-1 is the hydrogen atom at the anomeric C (α , β -configuration of glucose), s means substituted, and u unsubstituted.

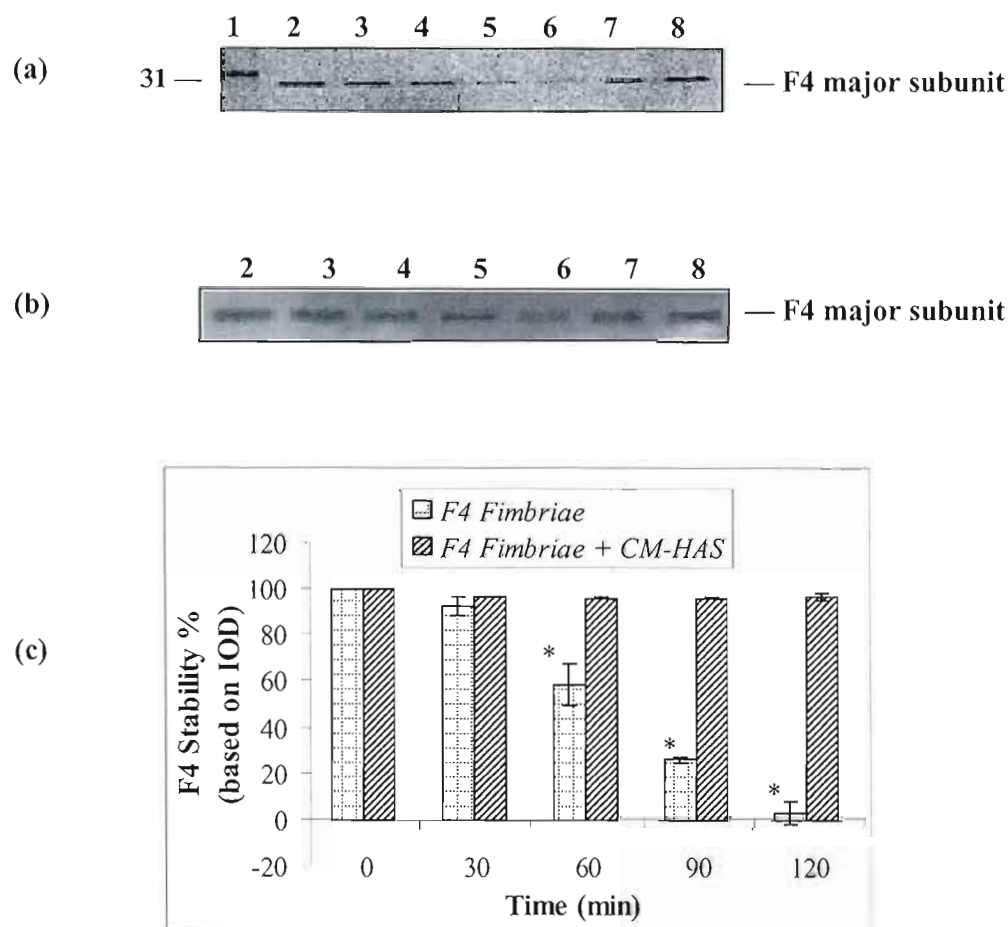


Fig. 2. Stability of F4 fimbriae in simulated gastric fluid (SGF/USP).

(a) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; (b) Western blotting; (c) densitometry analysis of Western blotting films. Electrophoretic profiles: molecular weight protein marker (31 kDa) (lane 1); free (non-formulated) F4 fimbriae in phosphate buffer solution (0 min) (2) and after 30 min (3), 60 min (4), 90 min (5), 120 min (6) in simulated gastric fluid containing pepsin (SGF); F4 fimbriae formulated with CM-HAS - as tablet - in phosphate buffer solution (0 min) (7) and after 120 min in SGF (8). Volume of fimbriae sample: 10 μ L/well. IOD, integrated optic density ($n=3$). Asterisks stand for significant differences within the same group of samples ($P \leq 0.01$).

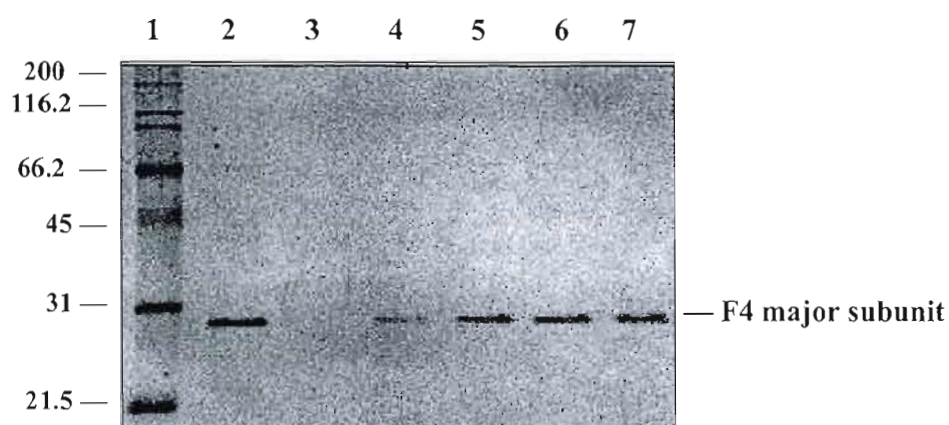


Fig. 3. Delivery of F4 *fimbriae* in pancreatin-free simulated intestinal fluid (SIF/USP).

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Electrophoretic profiles: molecular weight protein markers (kDa) (lane 1); F4 *fimbriae* formulated with CM-HAS - as tablet - in phosphate buffer solution (0 min) (2), after 1 h in simulated gastric fluid (pepsin) and 1 h (3), 2 h (4), 3 h (5), 4 h (6), 5 h (7) in pancreatin-free simulated intestinal fluid. Volume of *fimbriae* sample: 10 μ L/well ($n=3$).

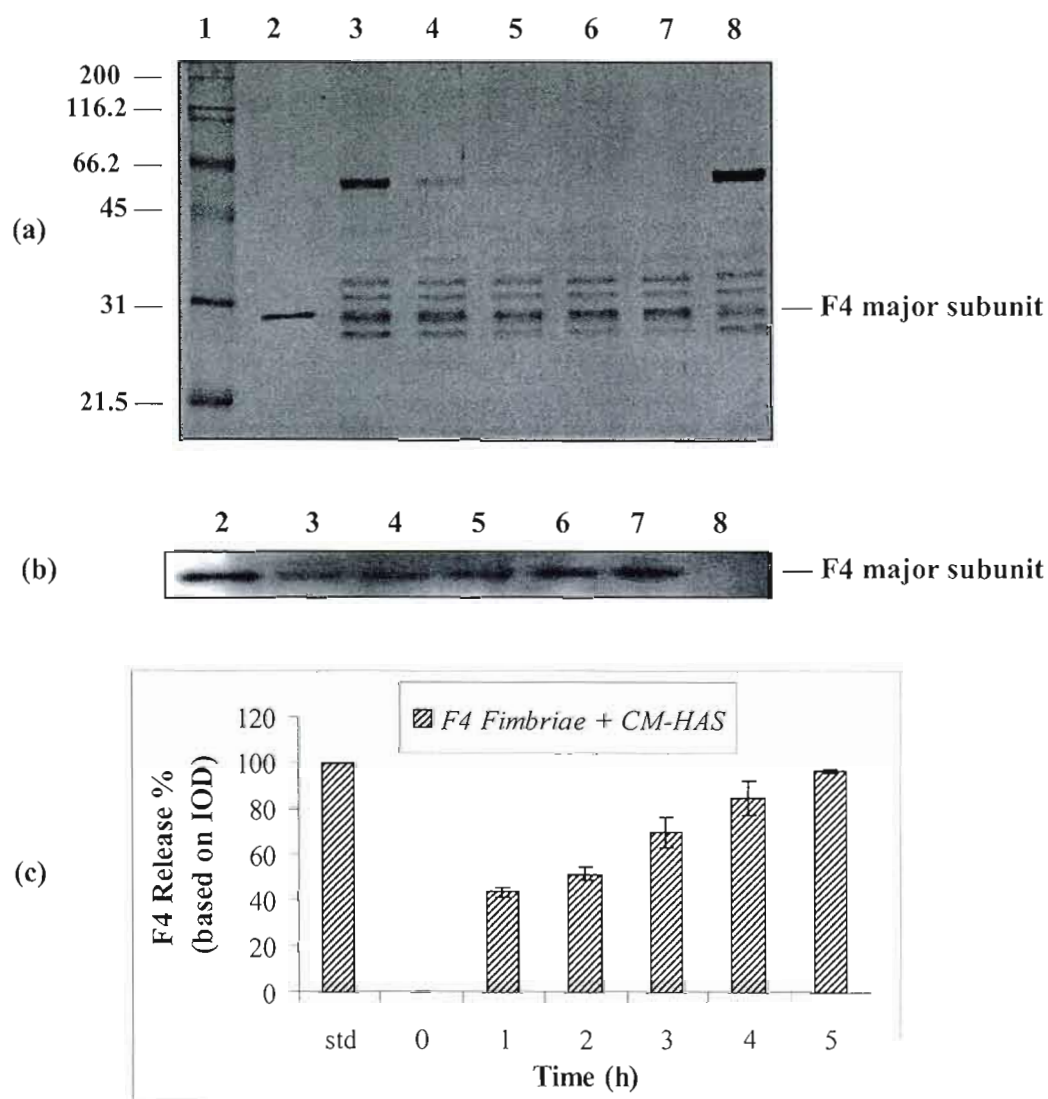
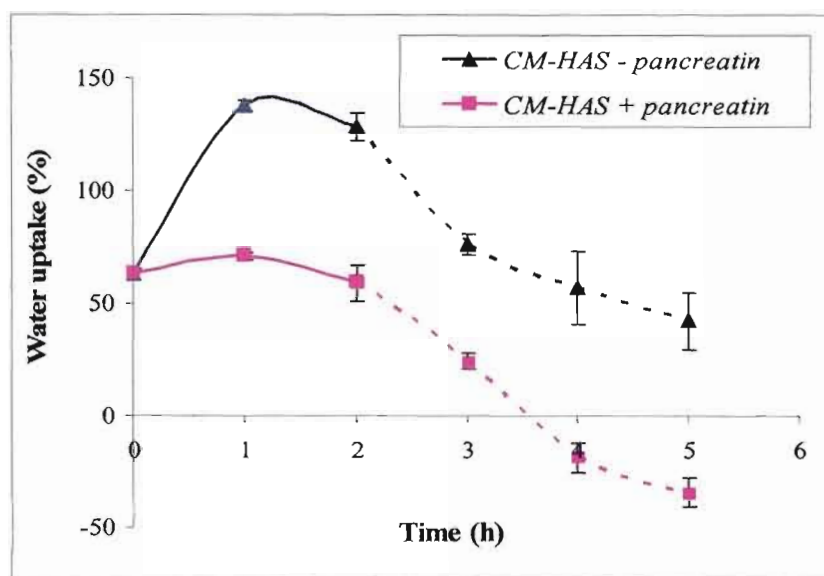


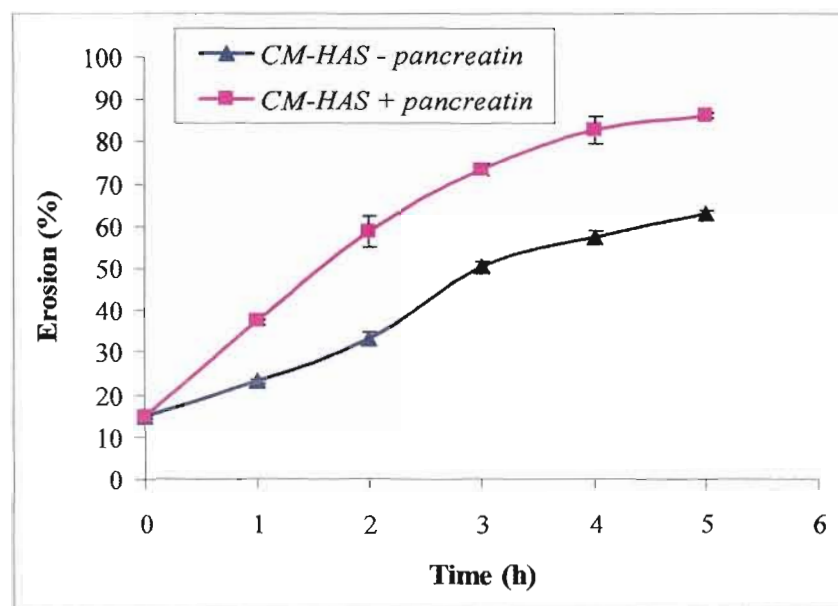
Fig. 4. Delivery of F4 *fimbriae* in simulated intestinal fluid containing pancreatin (SIF/USP).

(a) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; (b) Western blotting; (c) densitometry analysis of Western blotting films. Electrophoretic profiles: molecular weight protein markers (kDa) (lane 1); free (non-formulated) F4 fimbriae in phosphate buffer solution (0 min) (2); F4 formulated with CM-HAS after 1 h in simulated gastric fluid (pepsin) and 1 h (3), 2 h (4), 3 h (5), 4 h (6), 5 h (7) in simulated intestinal fluid containing pancreatin (SIF); SIF containing pancreatin only (8). Volume of fimbriae sample: 10 μ L/well. IOD, integrated optic density ($n=3$).

(a)



(b)



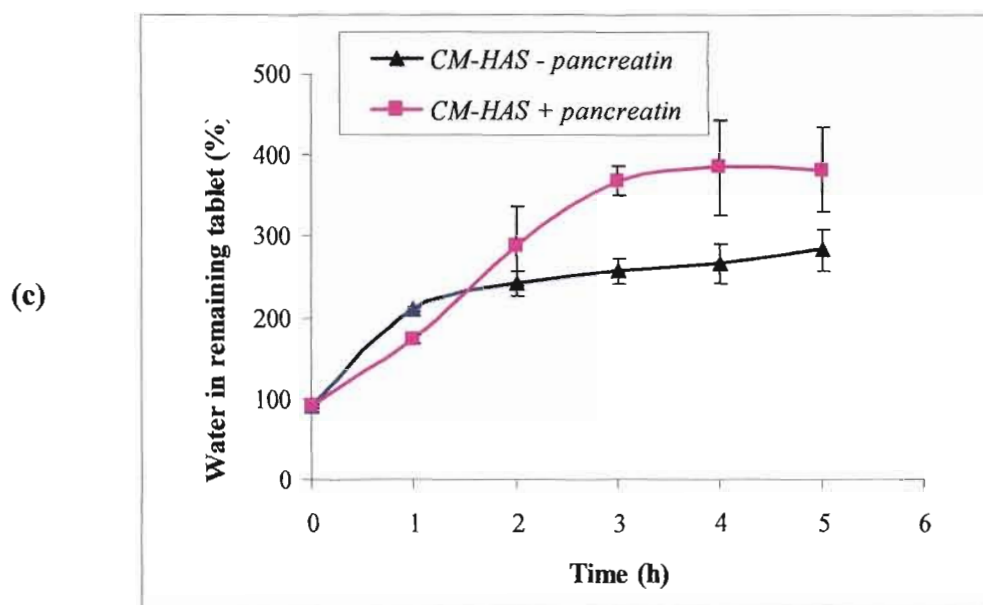


Fig. 5. Water uptake and erosion of CM-HAS tablet matrices.

(a) Water uptake (%), (b) erosion (%), (c) water normalized (%) for the mass of remaining eroded tablet. Tablets were treated for 1 h in simulated gastric fluid, followed by 5 h in simulated intestinal fluid with or without pancreatin ($n=3$). Dashed line: decrease of water uptake due to dissolution and erosion of the polymeric matrices, which are faster than the swelling.

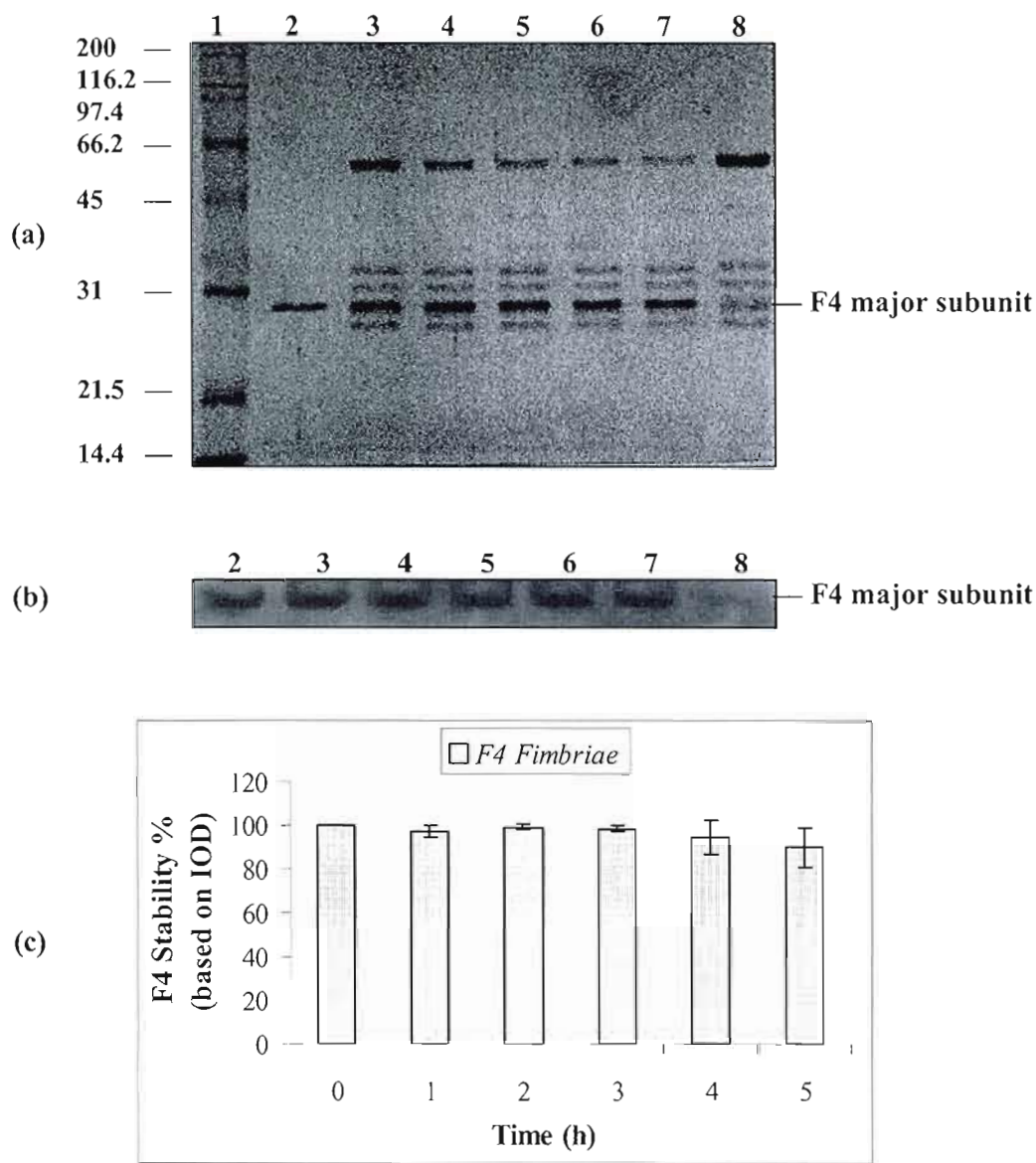


Fig. 6. Stability of F4 *fimbriae* in simulated intestinal fluid (SIF/USP).

(a) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; (b) Western blotting; (c) densitometry analysis of Western blotting films. Electrophoretic profiles: molecular weight protein markers (kDa) (lane 1); free (non-formulated) F4 *fimbriae* in phosphate buffer solution (0 min) (2) and after 1 h (3), 2 h (4), 3 h (5), 4 h (6), 5 h (7) in simulated intestinal fluid containing pancreatin (SIF); SIF containing pancreatin only (8). Volume of *fimbriae* sample: 10 μ L/well. IOD, integrated optic density ($n=3$).

CHAPITRE VI

MATRICE À BASE DE CARBOXYMÉTHYL AMIDON RICHE EN AMYLOSE: CHITOSANE POUR LA LIVRAISON DES PROBIOTIQUES AU NIVEAU DU CÔLON

Carmen Calinescu et Mircea Alexandru Mateescu

*Département de Chimie et Centre BioMed, Université du Québec à Montréal,
C.P. 8888, Succ. A, Montréal, Qué., Canada, H3C 3P8*

Résumé:

Un nouveau système hydrophilique sous forme de comprimé, basé sur une auto-stabilisation ionique entre un excipient avec des groupes carboxyle (carboxyméthyl amidon riche en amylose, CM-HAS) et un excipient avec des groupes amine (Chitosane) a été proposé pour la livraison d'un probiotique au niveau du côlon. Le CM-HAS (protoné et compact dans un milieu acide) assure gastro-protection et le Chitosane (faiblement soluble dans un milieu intestinal) prévient la libération rapide des bactéries de *Lactobacillus rhamnosus*. Ainsi, pour les comprimés monolithiques à base de CM-HAS:Chitosane, l'augmentation de la masse moléculaire du Chitosane et de son pourcentage dans la formulation a généré une diminution de la quantité de bactéries libérées. La masse moléculaire la plus élevée (2.2×10^6 g/mol) de Chitosane a retardé le plus efficacement la libération des bactéries. Les formulations monolithiques contenant des pourcentages élevés en CM-HAS (80%) ont libéré les bactéries après 2 h d'incubation dans les conditions gastro-intestinales pour toutes les masses moléculaires de Chitosane utilisées. Un mécanisme combiné de libération des bactéries est proposé pour les comprimés monolithiques à base de CM-HAS:Chitosane, impliquant le gonflement des comprimés (grâce au Chitosane), suivi par l'érosion et la dissolution du CM-HAS. De plus, la barrière de gel de Chitosane, formée dans les conditions acides, a aussi contribué au retardement de la livraison des bactéries. La présence du double-noyau à base de CM-HAS:Chitosane et avec du CM-HAS à la surface des comprimés monolithiques a eu une influence sur l'effet de la masse moléculaire du Chitosane dans le processus de libération des bactéries, en contribuant à l'augmentation du pourcentage des bactéries libérées dans le milieu qui simule les conditions intestinales.

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008, vol. 70, p. 582-589.

**Carboxymethyl high amylose starch: Chitosan self-stabilized matrix
for probiotic colon delivery**

Carmen Calinescu and Mircea Alexandru Mateescu*

*Department of Chemistry and Centre BioMed, Université du Québec à Montréal,
C.P. 8888, Succ. A, Montréal (Québec) Canada, H3C 3P8*

* Corresponding author

Tel.: +1 514 987 4319

Fax: +1 514 987 4054

E-mail address: mateescu.m-alexandru@uqam.ca

Abstract

A new hydrophilic tablet dosage system based on an ionic self-stabilization of a carboxylated (carboxymethyl high amylose starch, CM-HAS) and an amino (Chitosan) excipient was proposed for probiotic colon delivery. CM-HAS (protonated and compacted in acidic medium) ensures gastro-protection and Chitosan (low soluble in intestinal media) prevents early release of *Lactobacillus rhamnosus* bacteria. Thus, in CM-HAS:Chitosan monolithic tablets, increasing percentage and molecular weight (MW) of Chitosan generated a decrease of bacteria release rate, bacteria being the most effectively retarded by the highest MW of Chitosan (2.2×10^6 g/mol). The monolithic formulations containing high percentages of CM-HAS (80%) delivered bacteria after 2 h of incubation in gastrointestinal conditions for all the Chitosan MWs used. A combined mechanism of bacteria release is proposed for CM-HAS:Chitosan monolithic tablets, involving the swelling of the tablets (due to the Chitosan), followed by the erosion and dissolution of CM-HAS. In addition, a gel-forming barrier of Chitosan in acidic conditions also contributed to the delay of the bacteria delivery. The CM-HAS dry-coated monolithic tablets changed the effect of Chitosan molecular weight on bacteria liberation and improved the percentage of delivered bacteria in simulated intestinal conditions.

Keywords: Carboxymethyl high amylose starch; Chitosan; Tablet; *Lactobacillus rhamnosus* probiotic; Colon delivery.

1. Introduction

The interest of probiotics as remedies for a broad number of gastrointestinal diseases is continuously growing. Probiotics are live microorganisms administered as food supplements in order to improve the host intestinal microbial balance and to confer major health benefits such as modulation of the immune system [1,2], enhanced healing of damaged gastrointestinal mucosa [3], relapsing of *Clostridium difficile* diarrhea [4] and antagonism against pathogens (i.e. *Lactobacilli* able to compete with, exclude and displace pathogenic gastrointestinal bacteria when incubated together [5]). Widespread prescription of antibiotics is often associated with the disruption of the protective flora and can lead to predisposition to infections. The control of infections without using antibiotics is a large advantage and probiotic therapy represents a promising alternative. Among probiotic bacteria, *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* strains are largely present in humans. It has been shown that fecal levels of these strains were reduced in patients with inflammatory bowel disease (IBD), such as Crohn's disease and ulcerative colitis [6,7], suggesting an alteration of the colonic flora as one of the factors responsible for these diseases. Lactic acid bacteria impart further nutritional and therapeutic benefits such as: improved digestion of lactose [8], control of some types of cancer [9] and control of cholesterol levels [10]. To be effective, orally administered probiotics should be efficiently implanted in the intestine and adhesion to the intestinal mucosa is considered one of the beneficial health effects of probiotics. This requires that the cells survive during the preparation of dosage forms and passage through the acidic environment. Reaching the intestine, these microorganisms should be able to establish themselves, remain viable and perform their beneficial actions. In this context, oral formulations have to protect the bioactive agent from the gastric acidity and to deliver it to the intestinal site. Colon target is the main objective of drug formulation for the prevention and topical treatment of IBD or other infectious disorders and for therapy of colorectal cancer. Oral formulations for the colonic delivery should afford gastric protection of bioactive agents in the stomach

and delay their release through the small intestine in order to allow their complete release in the colon.

We have recently proposed CM-HAS as excipient for bioactive agent transport in simulated gastrointestinal conditions [11,12]. Thus, in a gastric acidity, CM-HAS (Na^+) changes the cation for a proton, resulting in a compact structure of the tablet and conferring gastro-stability of the active agent against acidic and enzymatic denaturation. In intestinal fluid, the protonated form of CM-HAS (H^+) will change the proton for cations, enhancing the water uptake and generating the polymeric swelling and matrix dissolution and the release of the bioactive agents. Thus, due to its relatively fast and total dissolution, which can be enhanced by enzymatic hydrolysis of alpha-amylase, CM-HAS alone may not be suitable in formulations of drugs aimed at colon delivery. Recently, we have proposed an association CM-HAS:Chitosan [13] in which both macromolecular excipients contribute to a physical and chemical stabilization of the matrix to formulate small molecules for intestinal delivery. We are now reporting a hydrophilic matrix based on binary mixtures of CM-HAS:Chitosan for colon delivery of lactic acid bacteria. It is well known that Chitosan, a linear polysaccharide consisting of β -(1-4)-linked 2-amino-2-deoxy-D-glucose still presenting a certain number of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose units, is a good matrix for the delayed liberation of active agents in colon. The Chitosan can be obtained by the partial alkaline [14] or enzymatical [15] *N*-deacetylation of naturally occurring chitin. An important advantage of Chitosan for its successful use in colon-targeting consists in its stability against the enzymes in duodenum and the lower intestinal tract, but susceptible to a certain degradation by colonic bacterial enzymes [16]. However, an important limitation can be its dissolution in the gastric medium due to the protonation of amino groups. To prevent this, the association of Chitosan with another excipient carrying carboxylic functions, such as alginate [17] or xanthan [18] has been suggested. The association of CM-HAS with Chitosan in monolithic tablet formulations is expected to assure a good stability of the tablet and a good viability of

bacteria in gastric conditions (due to the presence of CM-HAS) and, at the same time, to delay the bacteria liberation in intestinal media (due to the presence of Chitosan). To overcome certain aspects related to the high solubility of Chitosan in the simulated gastric media, we have also tested a novel double-layer system based on CM-HAS:Chitosan tablets coated with CM-HAS polymer.

The aim of this study was to investigate the effect of CM-HAS:Chitosan excipient association on the stability of monolithic and of CM-HAS dry-coated tablets and the effect of the Chitosan molecular weight on the delaying *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) probiotic delivery.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

High Amylose Starch (Hylon VII) was from National Starch (Bridgewater, NJ, USA). Chitosan 1 (98% degree of deacetylation, DDA) and Chitosan 2–4 (84% DDA) from crab shells were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA), where the numbers were ascribed to represent different molecular weights used in our formulations. Pepsin (porcine gastric mucosa) was from Sigma-Aldrich Chemical Company and pancreatin (porcine pancreas extract with alpha-amylase, lipase and proteolytic activities) from A&C American Chemicals Ltd. (Montréal, Qué., Canada).

The *Lactobacillus rhamnosus* probiotic bacteria (HA-111 strain) were generously supplied by Harmonium International Inc. (Mirabel, Qué., Canada). Difco™ *Lactobacilli* MRS (DeMan, Rogosa and Sharpe) agar, for the culture media, was from Fisher Scientific Company (Ottawa, Ont., Canada).

The other chemicals were of reagent grade and used without further purification.

2.2. Synthesis of polymeric derivative CM-HAS

The starch derivative was synthesized as previously described [12]. The CM-HAS powder, held overnight to air at room temperature, was ground in a blender, and then sieved to obtain a powder (particles granulometry between 75 and 300 μm), used to prepare the tablets.

The CM-HAS structure was analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and the degree of substitution (DS) was determined by nuclear magnetic resonance (^1H NMR) – 300 MHz (Varian Gemini) in deuterated dimethyl- d_6 sulfoxide (99.9 atom %D, CDN Isotopes, Qué., Canada) as previously described [12].

2.3. Chitosan preparation

All the purchased Chitosans were dissolved in 2% acetic acid solution and every viscous solution was passed through a filter paper to remove the undissolved residues. A solution of 1.0 M NaOH was added to the homogeneous filtrate until a pH of 6.5 and then, the Chitosan was precipitated with acetone. The precipitated polymer was thoroughly washed with distilled water, dried with 100% acetone and then dried at room temperature. The powders were sieved retaining fractions smaller than 300 μm for tablet formulations.

2.4. Molecular weight determination of Chitosan polymers

The molecular weight (MW) of the Chitosan samples was determined viscometrically using a Cannon-Ubbelohde semi-micro viscometer (State College, PA, USA) for increasing Chitosan concentrations (0.01-0.15 %) in 0.3 M acetic acid / 0.2M sodium acetate buffer at $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 0.05$ for Chitosan MW1 [19] or in 0.2 M acetic acid / 0.1 M sodium acetate buffer at $30\text{ }^\circ\text{C} \pm 0.05$ for Chitosan MW2-4 [20]. The flow time

data were used to calculate the intrinsic viscosity ($[\eta]$), as the intercept of the linear regression of reduced viscosity versus concentration extrapolated to zero concentration [20]. The average MW (MW_v) for each Chitosan type was determined from the intrinsic viscosity, using the Mark-Houwink-Sakurada Eq. (1) and the parameters K and a , obtained following Rinaudo et al. [19] and Wang et al. [20].

$$[\eta] = K \times MW_v^a \quad (1)$$

2.5. Monolithic and CM-HAS dry-coated tablet formulation

2.5.1. Preparation of monolithic tablets

Monolithic tablets (200 mg) based on CM-HAS:Chitosan excipients (different ratios) were obtained by direct compression of a homogenous mixture of dry powders containing 190 mg of CM-HAS and Chitosan excipient polymers and 10 mg of probiotic *L. rhamnosus* bacteria (representing 10^9 colony-forming units, CFU). The mixture was compressed at 2.5 T/cm^2 using a manual hydraulic Carver press (Wabash, IN, USA) and 9.0 mm cylinder outfits with flat-faced punches.

2.5.2. Preparation of CM-HAS dry-coated tablets

Monolithic tablets (200 mg) based on CM-HAS:Chitosan and containing 10 mg of bacteria were formulated as previously described. Then, they were double-faced coated with 300 mg CM-HAS polymer only: 130 mg CM-HAS on the inferior side and 170 mg CM-HAS on the lateral and upper sides of the monolithic tablet in the die. The compression was done at 2.5 T/cm^2 , using 13.0 mm cylinder outfits with flat-faced punches (obtaining dry-coated tablets of 500 mg).

2.6. *Bacteria delivery in the simulated gastric and intestinal media*

Monolithic (200 mg) and CM-HAS dry-coated (500 mg) tablets were incubated for 1 h in 50 mL of sterile simulated gastric fluid (SGF, pH 1.2) [21] and then transferred into 50 mL of sterile simulated intestinal fluid (SIF, pH 6.8) [21] and incubated for 24 h at 37 °C and 50 rpm, using an incubator shaker (Series 25D, New Brunswick Scientific Co., NJ, USA). Samples of 100 µL were taken after 1 h in SGF and at every hour in the SIF over the first 12 h and after 24 h of SIF to evaluate the viability of the liberated bacteria from the tablets. After 1 h SGF and 24 h in SIF, the tablets were crushed in the SIF medium to determine the number of bacteria still remained inside the tablet.

The number of CFU was counted on the aliquots removed and serially diluted in 0.1% sterile bacteriological peptone water and then cultured on MRS nutrient agar plates at 37 °C for 48 h, to calculate the number of living bacteria liberated in function of time.

The initial number of bacterial CFU in 10 mg of lyophilized bacteria was determined in sterile phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) at room temperature. As control, 10 mg of free bacteria was incubated in the same conditions as in the case of formulated bacteria: 1 h in 50 mL sterile SGF medium and, respectively, 24 h in 50 mL sterile SIF at 37 °C and 50 rpm. All the colonies were counted after aerobic incubation at 37 °C for 48 h.

2.7. *Water uptake and erosion studies*

Tablets based on 100% Chitosan (MW1-4), on 50% CM-HAS:50% Chitosan (MW1-4) and on 100% CM-HAS, each containing 10 mg of lyophilized *L. rhamnosus*, were kept in the same conditions as for the dissolution tests (at 50 rpm and 37 °C). For

the water uptake study, the hydrated tablets of 100% Chitosan (MW1-4) and of 50% CM-HAS:50% Chitosan (MW1-4) were removed from the dissolution medium after 1 h SGF and after every 2 h in SIF (during an overall duration of 12 h in SIF), blotted with tissue paper to eliminate the excess surface water and then weighed. The remaining dry weight of tablets was determined in an oven at 50 °C after 1 h SGF and after 2, 12 and 24 h of SIF incubation for matrices based on 100% Chitosan (MW1-4) and on 50% CM-HAS:50% Chitosan (MW1-4). Concerning the 100% CM-HAS matrix, the tests were performed after 1 h in SGF and after 2, 3 and 4 h only of SIF incubation due to rapid tablet dissolution. The percentage of water uptake and that of erosion were determined gravimetrically as previously described [12].

2.8. Scanning electron microscopy

2.8.1. Sample preparation

Monolithic and CM-HAS dry-coated tablets based on 100% Chitosan (MW1-4), on 50% CM-HAS:50% Chitosan (MW1-4) and on 100% CM-HAS, prepared as previously described (Section 2.5), were incubated for 1 h in SGF and then transferred for 6 h in SIF (50 rpm, 37 °C). Due to their faster dissolution in simulated intestinal media, the 100% CM-HAS monolithic tablets were incubated for 1 h in SGF and only 2 h in SIF (50 rpm, 37 °C). Then, the tablets were frozen and lyophilized for a week. The dry tablets were mounted on metal supports and their surface and intern (section) morphology were examined by an Hitachi S-4300SE/N variable pressure-scanning electron microscope (Hitachi High Technologies America, Pleasanton, CA, USA), using an environmental-scanning electron detector.

3. Results and discussion

The initial count of *L. rhamnosus* free cells dropped from 10^9 CFU to an undetectable level after exposure to a pH 1.2 (SGF) for 1 h, as expected, since *L. rhamnosus* is known to be sensitive in an acidic environment. When incubated in SIF (pH 6.8) for 24 h, the free bacteria population was maintained (data not shown).

Chitosan is a polycationic polymer in acidic environments and the basic nature of Chitosan depends on its degree of deacetylation. Before solubilization, Chitosan rapidly forms gels in acidic environments and this makes Chitosan interesting in relation to the development of slow-release dosage forms for oral administration. The MW of Chitosan excipients was determined by viscosimetry for Chitosan 1 (MW1: 1.2×10^5 g/mol), Chitosan 2 (MW2: 6.3×10^5 g/mol), Chitosan 3 (MW3: 9×10^5 g/mol) and Chitosan 4 (MW4: 2.2×10^6 g/mol).

The substitution of high amylose starch polymer was confirmed by FTIR (data not shown) and its degree of substitution (DS 0.25) was determined by NMR spectroscopy of a CM-HAS hydrolytically depolymerized sample.

The monolithic tablet formulations based on high percentages of Chitosan MW1 presented a capping phenomenon after 1 h in SGF and 1 h in SIF (100% Chitosan) and, respectively, after 2 h in SIF (80% Chitosan:20% CM-HAS), and the bacteria were rapidly liberated (Fig. 1a). An increase in CM-HAS percentage afforded a good stabilization of the CM-HAS:Chitosan MW1 monolithic tablet in intestinal medium. Thus, formulations based on 50% CM-HAS:50% Chitosan MW1 and on 80% CM-HAS:20% Chitosan MW1 preserved the shape of the tablet after 1 h in SGF and 12 h in SIF at 37 °C and 50 rpm, without any capping. This stabilization could be partially due to an *in situ* interaction between the carboxylic function of CM-HAS and amino

groups of Chitosan which could appear at the external layer and, in a certain extension, within the tablets, particularly with the advancement of the aqueous front.

From monolithic tablets based on 100% Chitosan MW2-4, there was no detectable level of bacteria liberation during 12 h of incubation in SIF, at 37 °C and 50 rpm (Fig. 1b-d). However, after 24 h of SIF incubation, low levels of released bacteria were found in the case of 100% Chitosan MW2-3 formulations and, at crushing of these tablets, a considerable amount of viable bacteria retained inside the tablets was found. The situation was different for the monolithic tablets based on 100% Chitosan MW4, which did not liberate the bacteria at all after 12/24h of SIF incubation, but a marked amount of living *L. rhamnosus* was still found inside the tablet (data not shown).

The Chitosan in solution is known to present some antibacterial activity [22]. As the pKa of Chitosan is about 6.5, below this pH the amino groups are positively charged and can interact with anionic groups of the microbial cell surface. Thus, Chitosan may bind and weaken the barrier function of the outer membrane of bacteria, altering the membrane permeability and producing metabolic disturbance and eventual death of bacteria [23]. In the case of bacteria formulated in monolithic tablet form, the gastric acidity in contact with the Chitosan is limited only to surface surroundings of the monolithic tablets. Furthermore, due to the protection afforded by the protonated carboxylic groups of CM-HAS [11] and because of possible hydrogen-bonding between the amino groups of Chitosan and hydroxyl and carboxyl groups of CM-HAS and, at the same time, of possible ionic stabilization between the amino groups of Chitosan and carboxylic functions of CM-HAS, its antibacterial effect seems greatly reduced. Increasing the ratio of the CM-HAS in the matrix, a larger number of CM-HAS macromolecules came in contact with SIF dissolution medium, and, hence, the matrix erosion is enhanced and a higher amount of living bacteria was delivered (Fig. 1a-d). The increasing MW of Chitosan generates a delay in delivery times of the active principle [24]. Therefore, bioactive agent release *in vitro* can be controlled by adequate

choice of the amount and of the MW of Chitosan in the tablet (Table 1, Fig. 1a-d), bacteria being the most effectively retarded by the highest MW of Chitosan. The monolithic formulations containing high percentages of CM-HAS (80%) delivered bacteria after 2 h for all the Chitosan MWs (Table 1).

The water uptake of CM-HAS:Chitosan monolithic tablets increased with the increase of Chitosan MW for both 100% Chitosan and 50% Chitosan:50% CM-HAS formulations (Fig. 2a and b). The Chitosan tablets presented a high water retention which could be advantageous for the development of slow-release formulations, because it might facilitate the formation of gels that would better control drug release.

The matrices based on 100% Chitosan (MW1-4), on 50% CM-HAS:50% Chitosan (MW1-4) and on 100% CM-HAS presented almost the same percentage of erosion after 1 h of SGF incubation (Fig. 3). At increased percentage of CM-HAS in CM-HAS:Chitosan monolithic formulations, the tablet erosion in SIF conditions was accelerated. Thus, tablets based on 100% Chitosan (MW1-4), with no CM-HAS at all, showed an erosion of only 16%-27%, while those based on 50% CM-HAS:50% Chitosan (MW1-4) presented an erosion between 55% and 65% after 12/24h of incubation in SIF (Fig. 3). The 100% CM-HAS matrix (particles granulometry between 75 and 300 μm) was rapidly eroded: 100% of matrix erosion was registered only after 1 h SGF and 4 h SIF (Fig. 3). A combined mechanism of bacteria release is proposed for CM-HAS:Chitosan monolithic tablets, involving the swelling of the tablets due to the Chitosan, followed by the erosion and dissolution of CM-HAS. In addition, a gel-forming barrier of Chitosan in acidic conditions also contributed to the delay of the bacteria delivery and depended on the amount (%) and on the MW of the Chitosan used in the formulation.

In the case of CM-HAS dry-coated tablets, the external double-layer of CM-HAS protected the CM-HAS:Chitosan tablet core against the acidity of SGF and, then, at a SIF pH of 6.8, it was deprotonated and eroded, affording a greater protection of bacteria. Since the gastric acidity did not enter in direct contact with Chitosan within the tablet, the amino groups of Chitosan may not be positively charged and thus, the antibacterial effect of Chitosan could be lowered. The CM-HAS dry-coating of monolithic tablets generated an unexpected change in the effect of Chitosan MW on bacterial liberation (Table 1), markedly improving the percentage of delivered bacteria in simulated intestinal conditions (Fig. 4a-d) in comparison with the monolithic formulations (Fig. 1a-d). The observed enhanced release of bacteria was attributable first to the erosion and dissolution of the CM-HAS external layer, favoring a substantial water uptake of Chitosan and, then, to the erosion and dissolution of the CM-HAS from the monolithic remaining core. Due to the presence of CM-HAS at the external surface of the tablet, the acidity did not enter until the core of the tablet and no Chitosan gel can be formed in SGF. Thus, in the absence of the Chitosan gel-controlling barrier, the bacteria were rapidly liberated. Even the CM-HAS dry-coated formulations which contain 100% Chitosan core (MW2-4) liberated a large quantity of *L. rhamnosus* during the 12 h of SIF incubation (Fig. 4a-d).

In the case of CM-HAS:Chitosan (MW2-4) monolithic formulations (84% DDA), with increasing MW of Chitosan, the bacteria release was delayed. This effect was not present in CM-HAS dry-coated formulations. Concerning the effect of the DDA on bacteria liberation, no conclusion could be reached from this study because the Chitosans used had different MWs (Chitosan MW1: 98% DDA and Chitosan MW2-4: 84% DDA). Since only the free (non-acetylated) amino groups bind protons, the charge density of the Chitosan depends on the ratio of the two monomers in a chain. It is known that for the same Chitosan MW, at increasing DDA, the viscosity of Chitosan increases because the polyelectrolytic characteristics of Chitosan become more marked. Thus, at a high DDA (98% for Chitosan MW1), Chitosan is highly charged in

acidic solution and less charged for smaller DDA (as 84 % for Chitosan MW2-4). Sakkinen et al. (2002) found that the drug release rate was controlled in a lesser extent by the DDA of high MW of Chitosan [25]. In contrast, Sabnis et al. (1997) reported that the changing the DDA of Chitosan could control the drug release [26] and that higher DDA results in increasing formation of a rate-limiting Chitosan gel-barrier and in decreasing drug release rates from tablets (pH 1.2). However, the Chitosan of low MW used in the later case may explain the different findings from the two studies.

The surface morphology of CM-HAS and/or Chitosan tablets was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) for monolithic and CM-HAS dry-coated tablets. Generally, the surface of the 100% Chitosan monolithic tablets was dense (Fig. 5a). The external surface of 50% CM-HAS:50% Chitosan monolithic matrices showed large voids within a dense matrix (Fig. 5b), similar results being obtained for Chitosan MW2-4. For the matrix based on 50% CM-HAS:50 % Chitosan MW1, the surface structure was different (Fig. 5c). The 100% CM-HAS matrix had a porous structure (Fig. 5d), drastically differing from that of 100% Chitosan matrix (Fig. 5a).

After 1 h in SGF and 6 h in SIF, there were some morphology differences between the monolithic and the CM-HAS dry-coated formulations based on 100% Chitosan and on 50% CM-HAS:50% Chitosan, with the loss of dense surface for the formulations coated with CM-HAS (Fig. 5a'-b'), similar results being observed for MW2-4 of Chitosan. This aspect confirmed the fact that, in the presence of CM-HAS external layer, the Chitosan within the tablet did not enter in direct contact with the gastric acidity and, thus, did not form the dense, gel-barrier that controls the bacteria liberation in SIF medium. Concerning the internal structure of CM-HAS dry-coated 50% CM-HAS:50% Chitosan formulations, there were no morphology differences between the tablets made with the four MW of Chitosan (data not shown).

In vivo, the Chitosan is known to be degraded by enzymes produced by bacteria present in the colon. Zhang and Neau [27] reported that both MW and DDA affect the Chitosan degradation by colonic enzymes. Lower MW and DDA of Chitosan favored a faster degradation rate. It was also reported that the pH may decrease in the colon as compared with the pH of the small intestine [28] due to the acidification of the colonic contents by the products of bacterial fermentation. This lower pH could contribute to enhanced Chitosan degradation and to a better colonic liberation of bioactive agent.

The novelty of our formulation is the ionic self-stabilization of the two carboxylated (CM-HAS) and amino (Chitosan) polymers which ensure a two-step pH sensitive protection of bioactive agents. Thus, CM-HAS (protonated and compacted in acidic medium) ensures gastro-protection and it is susceptible to alpha-amylase attack, modulating the bacteria release, whereas Chitosan hydrogel (deprotonated in intestinal fluid) ensures stabilization against pancreatic enzymes. Furthermore, Chitosan, low soluble in neutral media, prevents early release of bacteria, which can be thus delivered to the colon. The advantages of the use of CM-HAS versus other carboxylic matrices (i.e. alginate, xanthan) associated with Chitosan is that our CM-HAS, with less carboxyl equivalents/monomer, is supposed to be less adhesive in the early gastrointestinal segments, enhancing thus the colon delivery.

In conclusion, CM-HAS association with Chitosan (monolithic tablets) can modulate the Chitosan excipient properties as probiotic agent carrier, increasing the number of liberated living bacteria, with the bacteria release modulated by the molecular weight of Chitosan. Concerning the dry-coated tablets, the CM-HAS external layer afforded a better protection of bacteria, with an enhanced number of CFU of *L. rhamnosus* delivered in simulated intestinal conditions. In this context, the CM-HAS could be an efficient excipient for dry-coated formulations for colon delivery.

Acknowledgements

The Canada graduate studentship from NSERC granted to Carmen Calinescu is gratefully acknowledged. Thanks are due to Dr. Francine Mondou (Harmonium International Inc., Canada) for generous supply of the *Lactobacillus rhamnosus* and to Dr. Alain Richard (Gestion Valeo Inc.) for the interest in this project.

References

- [1] E.J. Schiffrin, D. Brassart, A.L. Servin, F. Rochat, A. Donnet-Hughes, Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection, *Am. J. Clin. Nutr.* 66 (1997) 515S-520S.
- [2] M.D. Parra, B.E. Martinez de Morentin, J.M. Cobo, A. Mateos, J.A. Martinez, Daily ingestion of fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN114001 improves innate-defense capacity in healthy middle-aged people, *J. Physiol. Biochem.* 60 (2004) 85-91.
- [3] S.N. Elliot, A. Buret, W. McKnight, M.J. Miller, J.L. Wallace, Bacteria rapidly colonize and modulate healing of gastric ulcers in rats, *Am. J. Physiol.* 275 (1998) G425-G432.
- [4] R.G. Bennet, S.L. Gorbach, B.R. Goldin, Treatment of relapsing *Clostridium difficile* diarrhea with *Lactobacillus* GG, *Nutrition Today* 31 (1996) 35S-38S.
- [5] Y.K. Lee, K.Y. Puong, A.C. Ouwehand, S. Salminen, Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by *Lactobacilli*, *J. Med. Microbiol.* 52 (2003) 925-930.
- [6] M.G. Hartley, M.J. Hudson, E.T. Swarbrick, M.J. Hill, A.E. Gent, M.D. Hellier, R.H. Grace, The rectal mucosa-associated microflora in patients with ulcerative colitis, *J. Med. Microbiol.* 36 (1992) 96-103.
- [7] C. Favier, C. Neut, C. Mizon, A. Cortot, J.F. Colombel, J. Mizon, Fecal beta-D-galactosidase production and *Bifidobacteria* are decreased in Crohn's disease, *Dig. Dis. Sci.* 42 (1997) 817-822.
- [8] H. Hove, H. Norgaard, P.B. Mortensen, Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract, *Eur. J. Clin. Nutr.* 53 (1999) 339-350.
- [9] Y. Aso, H. Akaza, T. Kotake, T. Tsukamoto, K. Imai, S. Naito, Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial, *Eur. Urol.* 27 (1995) 104-109.
- [10] J.W. Anderson, S.E. Gilliland, Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans, *J. Am. Coll. Nutr.* 18 (1999) 43-50.
- [11] C. Calinescu, J. Mulhbach, É. Nadeau, J.M. Fairbrother, M.A. Mateescu, Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipient for *Escherichia coli* oral formulations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60 (2005) 53-60.

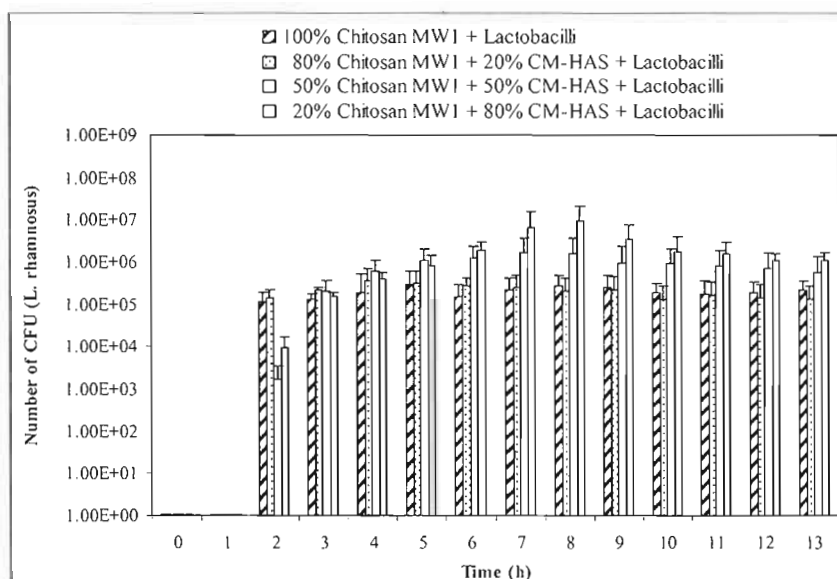
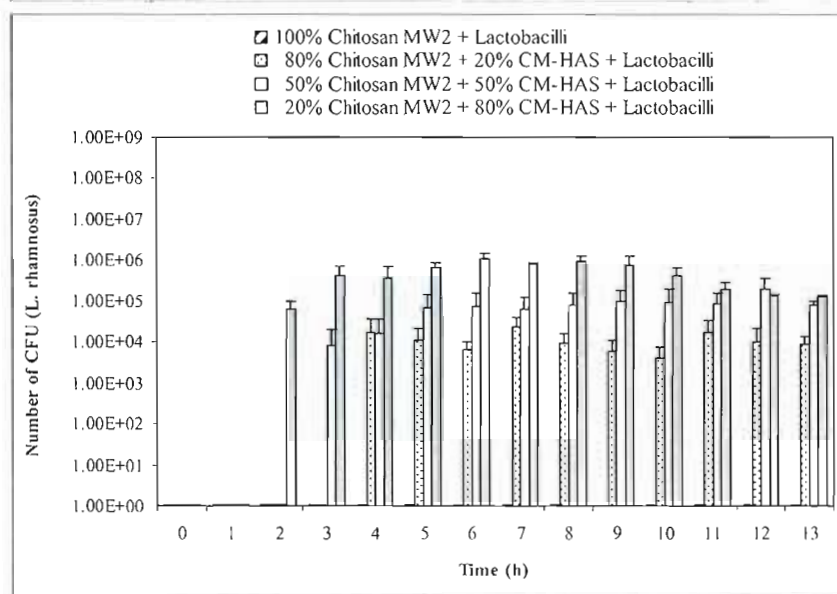
- [12] C. Calinescu, E. Nadeau, J. Mulhbach, J.M. Fairbrother, M.A. Mateescu, Carboxymethyl high amylose starch for F4 *fimbrae* gastro-resistant oral formulation, *Int. J. Pharm.* 343 (2007) 18-25.
- [13] M. Leonida, M.A. Mateescu, Drug release profiles from Chitosan – Carboxymethyl-starch matrices stabilized by ionic interactions. Transactions of the 33rd Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, 2006, # 827.
- [14] K.L.B. Chang, G. Tsai, J. Lee, W.R. Fu, Heterogeneous *N*-deacetylation of chitin in alkaline solution, *Carbohydr. Res.* 303 (1997) 327-332.
- [15] Y. Araki, E. Ito, Chitin deacetylase, *Methods Enzymol.* 161 (1988) 510-514.
- [16] H. Tozaki, J. Komoike, C. Tada, T. Maruyama, A. Terabe, T. Suzuki, A. Yamamoto, S. Muranishi, Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: improvement of insulin absorption from the rat colon, *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 1016-1021.
- [17] S. Miyazaki, A. Nakayama, M. Oda, M. Takada, D. Attwood, Drug release from oral mucosal adhesive tablets of chitosan and sodium alginate, *Int. J. Pharm.* 118 (1995) 257-263.
- [18] F. Chellat, M. Tabrizian, S. Dumitriu, E. Chornet, P. Magny, C.H. Rivard, L. Yahia, *In vitro* and *in vivo* biocompatibility of chitosan-xanthan polyionic complex, *J. Biomed. Mater. Res.* 51 (2000) 107-116.
- [19] M. Rinaudo, M. Milas, P.L. Dung, Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion, *Int. J. Biol. Macromol.* 15 (1993) 281-285.
- [20] W. Wang, S. Bo, S. Li, W. Qin, Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation, *Int. J. Biol. Macromol.* 13 (1991) 281-285.
- [21] U. S. Pharmacopeia National Formulary U.S.P. XXIV, NF XIX, United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD, 2000.
- [22] H.K. No, N.Y. Park, S.H. Lee, S.P. Meyers, Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights, *Int. J. Food Microbiol.* 74 (2002) 65-72.
- [23] D.H. Young, H. Kohle, H. Kauss, Effect of chitosan on membrane permeability of suspension-cultured *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris* cells, *Plant Physiol.* 70 (1982) 1449-1454.

- [24] J. Kristl, J. Smid-Korbar, E. Struc, M. Schara, H. Rupprecht, Hydrocolloids and gels of chitosan as drug carriers, *Int. J. Pharm.* 99 (1993) 13-19.
- [25] M. Sakkinen, U. Seppala, P. Heinanen, M. Marvola, *In vitro* evaluation of microcrystalline chitosan (MCCh) as gel-forming excipient in matrix granules, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 54 (2002) 33-40.
- [26] S. Sabnis, P. Rege, L.H. Block, Use of chitosan in compressed tablets of diclofenac sodium: inhibition of drug release in an acidic environment, *Pharm. Dev. Technol.* 2 (1997) 243-255.
- [27] H. Zhang, S.H. Neau, *In vitro* degradation of chitosan by bacterial enzymes from rat cecal and colonic contents, *Biomaterials* 23 (2002) 2761-2766.
- [28] G. Pye, D.F. Evans, S. Ledingham, J.D. Hardcastle, Gastrointestinal intraluminal pH in normal subjects and those with colorectal adenoma or carcinoma, *Gut* 31 (1990) 1355-1357.

Table 1. Modulation of bacteria liberation from CM-HAS:Chitosan formulations by different molecular weights of Chitosan

| Tablets | Monolithic (h) | | | | CM-HAS dry-coated (h) | | | |
|---------------|----------------|-----|-----|-----|-----------------------|-----|-----|-----|
| Chitosan Type | 100% | 80% | 50% | 20% | 100% | 80% | 50% | 20% |
| MW1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 5 | 4 | 4 | 4 |
| MW2 | – | 4 | 3 | 2 | 3 | 3 | 5 | 5 |
| MW3 | – | – | 8 | 2 | 4 | 3 | 3 | 5 |
| MW4 | – | – | – | 2 | 2 | 3 | 3 | 4 |

Tablets based on different ratios of CM-HAS:Chitosan (where the degree of substitution of CM-HAS was 0.25 and Chitosan was of different MW1-4) have been incubated for 1 h in simulated gastric fluid (SGF, pH 1.2) and 12 h in simulated intestinal fluid (SIF, pH 6.8), at 37 °C and 50 rpm. (–) means no detectable level of liberated bacteria after 1 h in SGF and 12 h in SIF. Chitosan MW1: 1.2×10^5 g/mol, Chitosan MW2: 6.3×10^5 g/mol, Chitosan MW3: 9×10^5 g/mol and Chitosan MW4: 2.2×10^6 g/mol.

a**b**

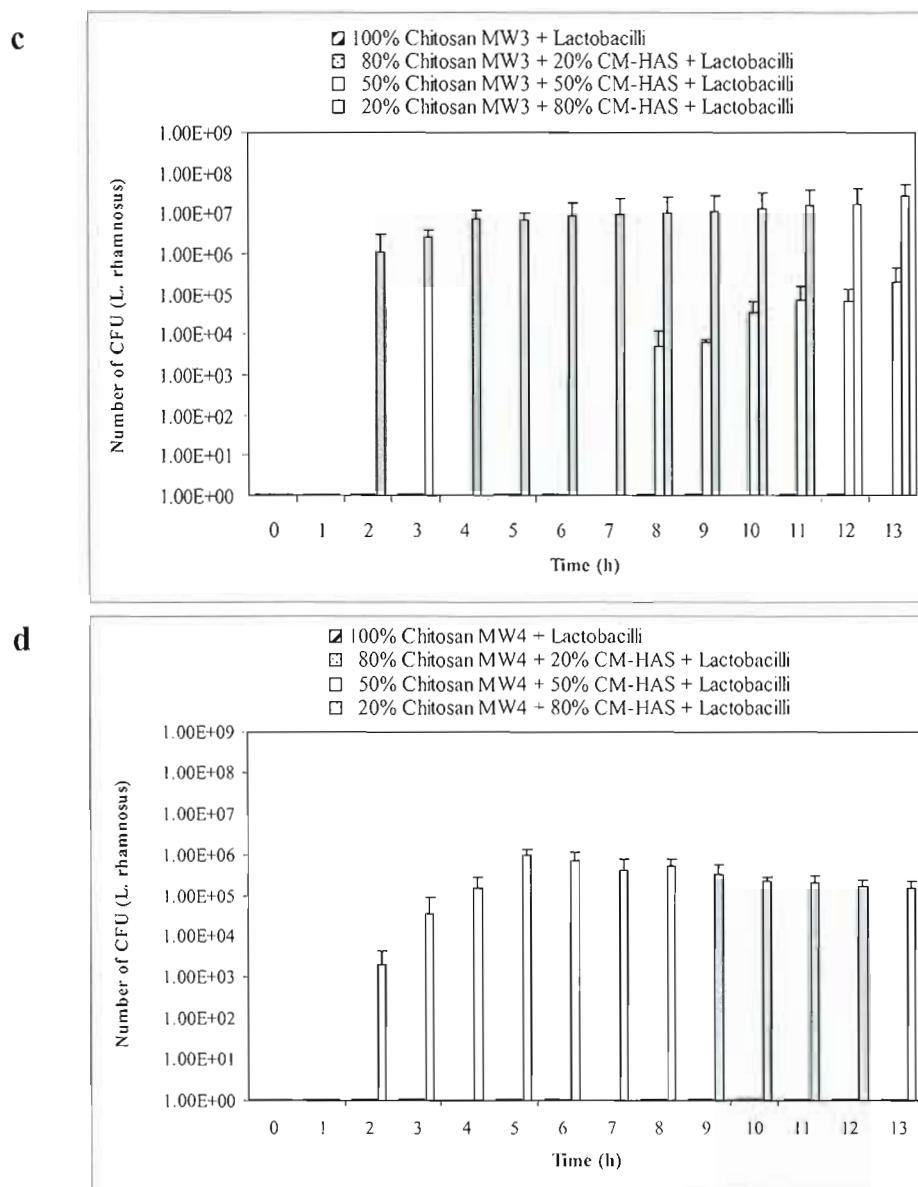


Fig.1. Liberation of living *Lactobacillus rhamnosus* formulated in CM-HAS: Chitosan (MW1-4) monolithic tablets following incubation in gastric and intestinal medium.

The tablets were incubated for 1 h in simulated gastric fluid and then transferred into simulated intestinal fluid for 12 h at 37 °C and 50 rpm. CM-HAS:Chitosan formulations based on (a) Chitosan MW1: 1.2×10^5 g/mol, (b) Chitosan MW2: 6.3×10^5 g/mol, (c) Chitosan MW3: 9×10^5 g/mol and (d) Chitosan MW4: 2.2×10^6 g/mol ($n = 3$). The bacterial number at the undetectable level was considered to be zero. CFU, colony-forming units.

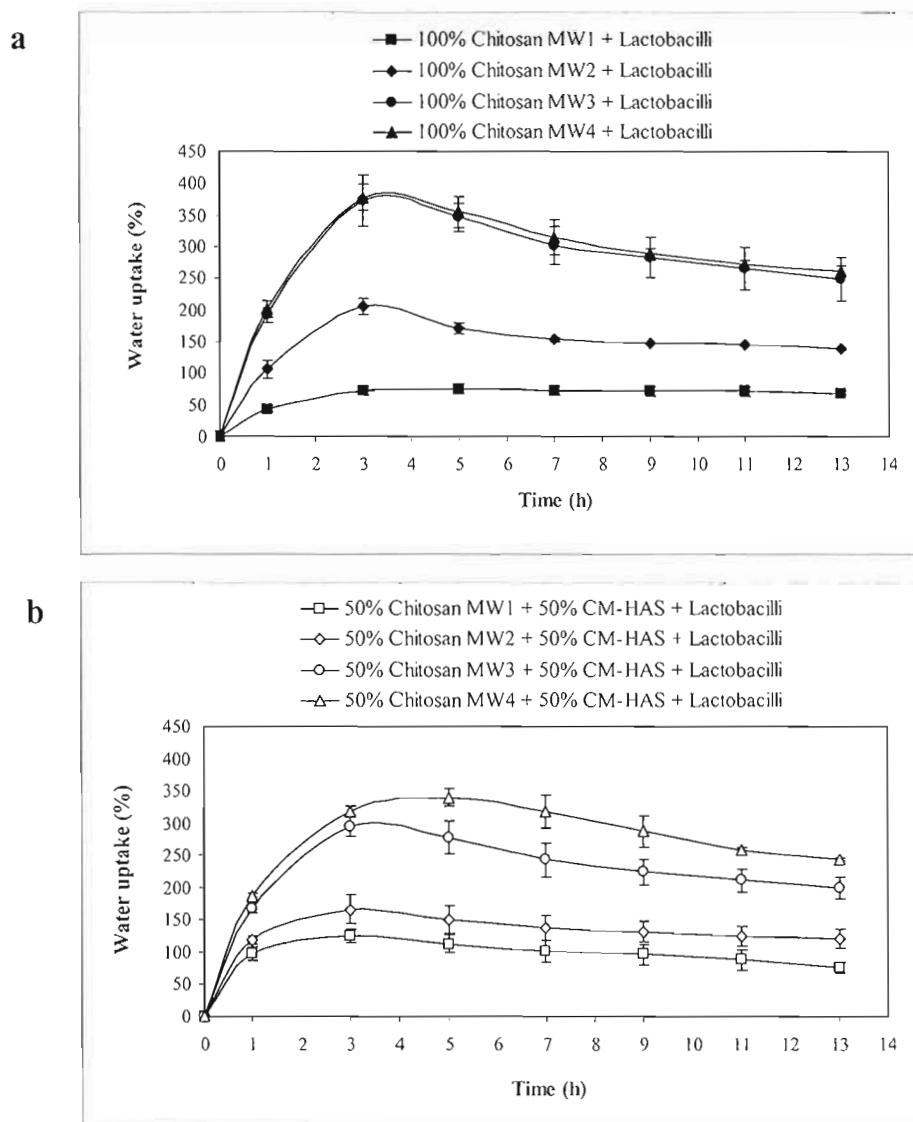


Fig.2. Water uptake of monolithic matrices based on CM-HAS:Chitosan (MW1-4)

The tablets were incubated for 1 h in simulated gastric fluid and 12 h in simulated intestinal fluid, at 37 °C and 50 rpm. (a) 100% Chitosan MW1-4 monolithic tablets, (b) 50% CM-HAS:50% Chitosan (MW1-4) monolithic tablets ($n = 3$). Chitosan MW1: 1.2×10^5 g/mol, Chitosan MW2: 6.3×10^5 g/mol, Chitosan MW3: 9×10^5 g/mol and Chitosan MW4: 2.2×10^6 g/mol.

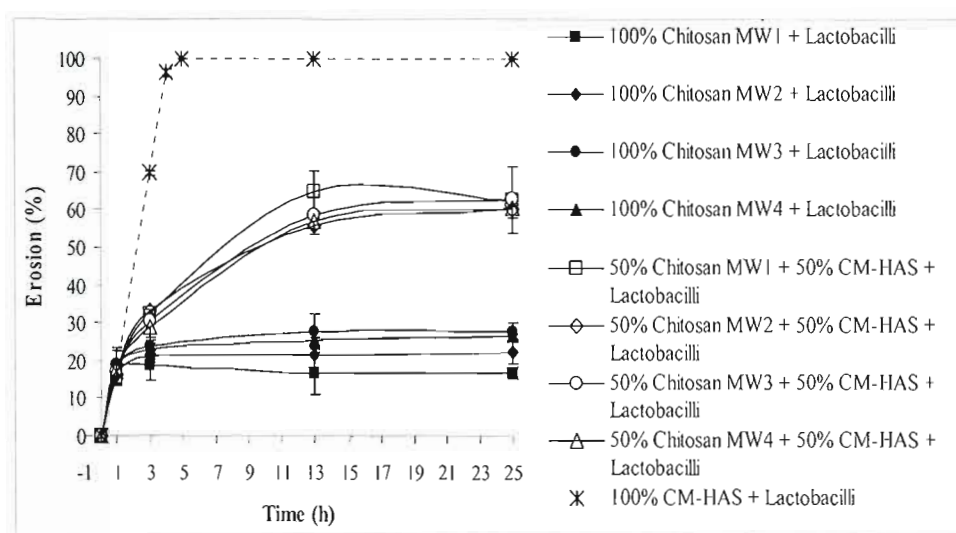
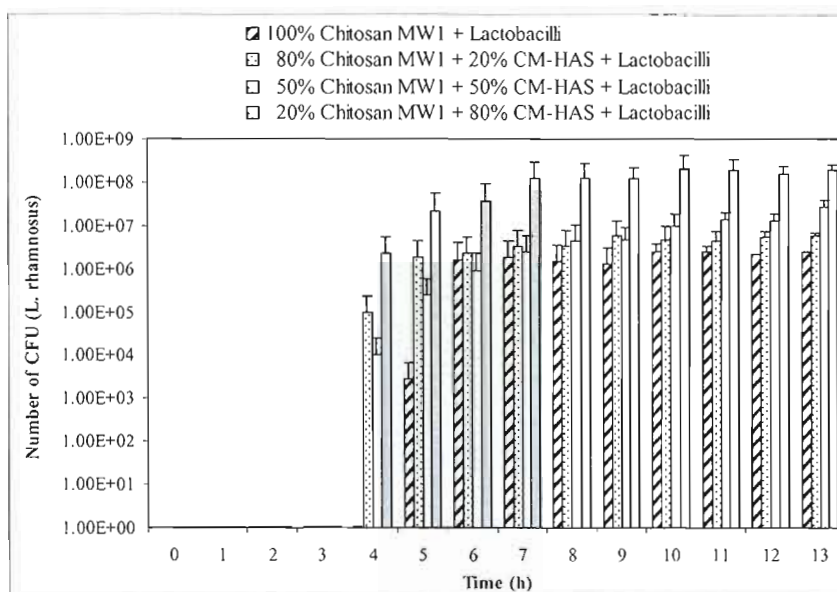
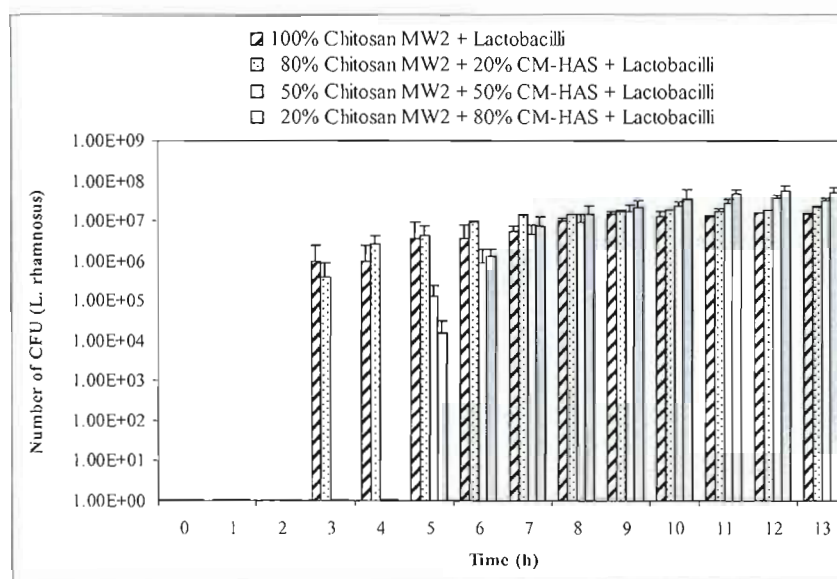


Fig.3. Erosion studies of CM-HAS:Chitosan (MW1-4) monolithic tablets.

The tablets were incubated for 1 h in simulated gastric fluid and 24 h in simulated intestinal fluid, at 50 rpm and 37 °C ($n = 3$). Chitosan MW1: 1.2×10^5 g/mol, Chitosan MW2: 6.3×10^5 g/mol, Chitosan MW3: 9×10^5 g/mol and Chitosan MW4: 2.2×10^6 g/mol.

a**b**

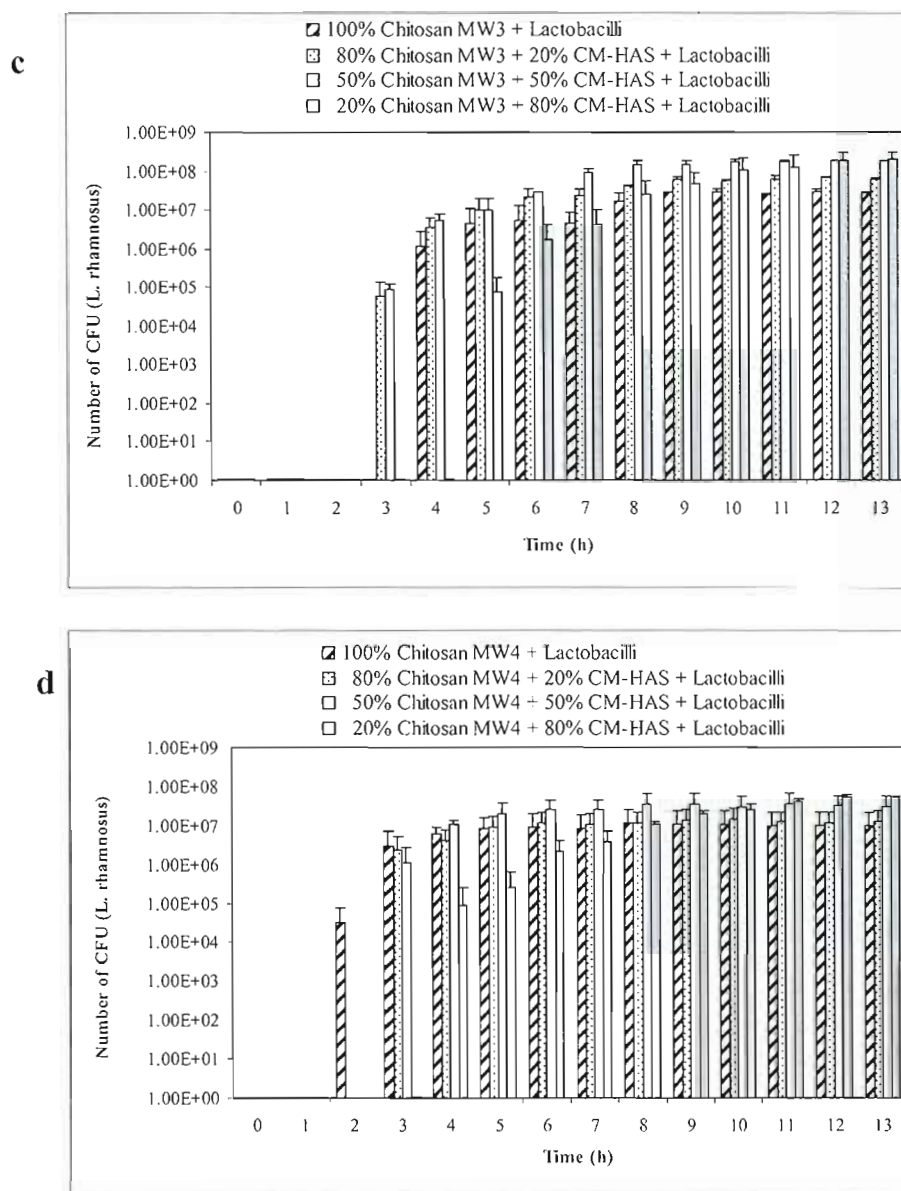


Fig.4. Liberation of living *Lactobacillus rhamnosus* formulated in CM-HAS dry coated tablets containing CM-HAS:Chitosan (MW1-4) core following incubation in gastric and intestinal medium.

The tablets were incubated for 1 h in simulated gastric fluid and then transferred into simulated intestinal fluid for 12 h, at 37 °C and 50 rpm. CM-HAS:Chitosan formulations based on (a) Chitosan MW1: 1.2×10^5 g/mol, (b) Chitosan MW2: 6.3×10^5 g/mol, (c) Chitosan MW3: 9×10^5 g/mol and (d) Chitosan MW4: 2.2×10^6 g/mol ($n = 3$). The bacterial number at the undetectable level was considered to be zero. CFU, colony-forming units.

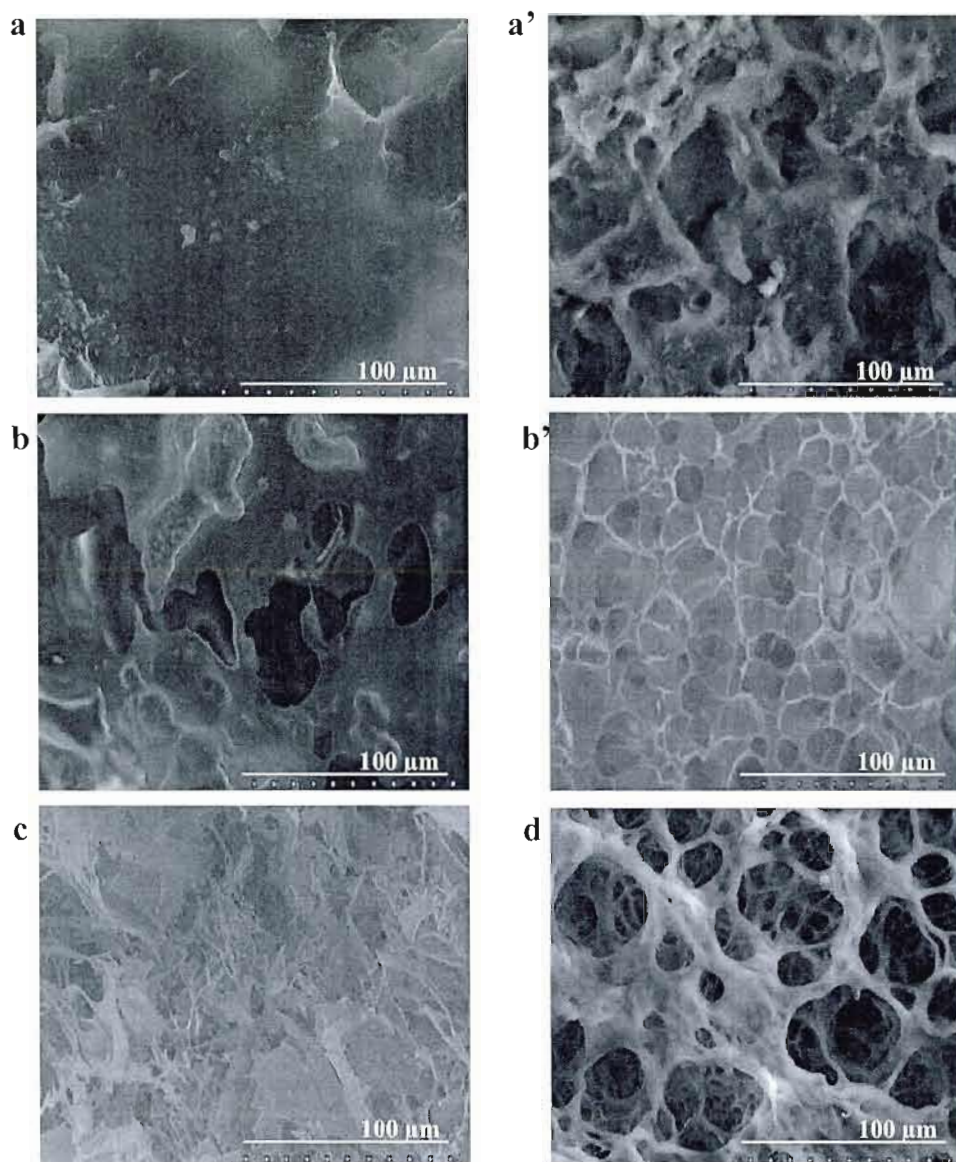


Fig.5. Scanning electron microscopy images from surface structures of CM-HAS:Chitosan matrices.

(a) 100% Chitosan MW4 monolithic and (a') dry-coated tablet, (b) 50% CM-HAS:50% Chitosan MW4 monolithic and (b') dry-coated tablet, (c) 50% CM-HAS:50% Chitosan MW1 monolithic tablet, (d) 100% CM-HAS monolithic tablet. Only with the exception of 100% CM-HAS monolithic tablet (which was kept for 1 h in simulated gastric fluid/SGF and 2 h in simulated intestinal fluid/ SIF), all the other tablets were kept for 1 h in SGF and 6 h in SIF, at 37 °C and 50 rpm. The tablets were frozen and lyophilized for a week, then, they were analyzed by scanning electron microscopy ($n = 3$). Chitosan MW1: 1.2×10^5 g/mol and Chitosan MW4: 2.2×10^6 g/mol.

CHAPITRE VII

ZYMOGRAPHIE DE LA DIAMINE OXYDASE VÉGÉTALE EN UTILISANT UN GEL DE POLYACRYLAMIDE CONTENANT LA PEROXYDASE IMMOBILISÉE. UNE ÉTUDE DE STABILITÉ À LA PROTÉOLYSE

Carmen Calinescu ¹, Rodolfo Federico ², Bruno Mondovi ³ et
Mircea Alexandru Mateescu ¹

¹ *Département de Chimie et Centre BioMed, Université du Québec à Montréal,
CP 8888, Succ. A, Montréal, Qc H3C 3P8, Canada*

² *Département de Biologie, Université de Rome 3, 00146 Rome, Italie*

³ *Département des Sciences Biochimiques "Rossi-Fanelli",
Université de Rome "La Sapienza", 00185 Rome, Italie*

Résumé:

Cet article décrit une méthode zymographique modifiée pour la diamine oxydase (DAO, histaminase, EC 1.4.3.6), basée sur une réaction couplée à la peroxydase, avec la peroxydase immobilisée dans les gels de polyacrylamide. La méthode proposée permet d'évaluer la stabilité de la DAO à la protéolyse dans les conditions qui simulent les milieux gastrique et intestinal. L'activité de la DAO provenant d'un extrait végétal des germes de *Lathyrus sativus* a été déterminée directement sur des gels d'électrophorèse de polyacrylamide, en présence de dodécyl sulfate de sodium et de la peroxydase immobilisée, avec putrescine comme substrat de la DAO et l'*ortho*-phénylène diamine comme co-substrat pour la peroxydase. L'accumulation d'azo-aniline, comme produit d'oxydation de la réaction catalysée par la peroxydase, a conduit à l'apparition des bandes jaunes-brunes bien-définies sur gels. L'intensité de ces bandes a été corrélée avec l'activité enzymatique de la DAO. Suite à l'analyse d'image des gels, une dépendance linéaire du contenu en DAO (bandes colorées avec Coomassie) et de son activité enzymatique (bandes zymographiques) avec la concentration de l'extrait végétal a été obtenue. Dans les conditions qui simulent le milieu gastrique (pH 1.2, 37 °C), la DAO provenant de l'extrait végétal a perdu son activité enzymatique durant les 15 min d'incubation, tant en présence qu'en absence de

la pepsine. Le profil protéique (Coomassie) a révélé que le contenu de l'extrait végétal en DAO a été maintenu presque constant dans le fluide intestinal simulé (contenant ou non la pancréatine), avec une faible diminution en présence des protéases pancréatiques. Après 10 h d'incubation à 37 °C, l'activité enzymatique de la DAO (extrait végétal) a été de 44.7% dans le milieu sans pancréatine et de 13.6% en présence de la pancréatine. La DAO purifiée a retenu seulement 4.65% de son activité enzymatique initiale en présence de la pancréatine.

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, vol. 396, p. 1281-1290.

**Zymographic assay of plant diamine oxidase on entrapped peroxidase
polyacrylamide gel electrophoresis. A study of stability to proteolysis**

Carmen Calinescu ¹, Rodolfo Federico ², Bruno Mondovi ³, and
Mircea Alexandru Mateescu ^{1*}

¹ *Department of Chemistry and Centre BioMed, Université du Québec à Montréal,
CP 8888, Succ. A, Montréal Qc H3C 3P8, Canada*

² *Department of Biology, 3rd University of Rome, 00146 Rome, Italy*

³ *Department of Biochemical Sciences "Rossi-Fanelli",
University of Rome "La Sapienza" 00185 Rome, Italy*

** Corresponding author*

Tel.: +1 514 987 4319

Fax: +1 514 987 4054

E-mail address: mateescu.m-alexandru@uqam.ca

Abstract

A zymographic assay of diamine oxidase (DAO, histaminase, EC 1.4.3.6), based on a coupled peroxidase reaction, and its behaviour at proteolysis in simulated gastric and intestinal conditions, are described. The DAO activity from a vegetal extract of *Lathyrus sativus* seedlings was directly determined on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide electrophoretic gels containing entrapped horseradish peroxidase, with putrescine as substrate of histaminase and *ortho*-phenylenediamine as co-substrate of peroxidase. The accumulation of azo-aniline, as peroxidase-catalyzed oxidation product, led to well-defined yellow-brown bands on gels, with intensities corresponding to the enzymatic activity of DAO. After image analysis of gels, a linear dependency of DAO content (Coomassie-stained protein bands) and of its enzymatic activity (zymographic bands) with the concentration of the vegetal extract was obtained. In simulated gastric conditions (pH 1.2, 37 °C), the DAO from the vegetal extract lost its enzymatic activity before 15 min of incubation, either in the presence or absence of pepsin. The protein pattern (Coomassie stained) revealed that the DAO content from the vegetal extract was kept almost constant in the simulated intestinal fluid (containing pancreatin or not), with a slight diminution in the presence of pancreatic proteases. After 10 h of incubation at 37 °C, the DAO enzymatic activity from the vegetal extract was 44.7% in media without pancreatin and 13.6% in the presence of pancreatin, whereas the purified DAO retained only 4.65% of its initial enzymatic activity in the presence of pancreatin.

Keywords Diamine oxidase, Zymographic assay, Entrapped peroxidase polyacrylamide gel, Proteolytic stability, Simulated gastro-intestinal conditions.

Introduction

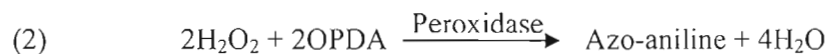
Plant diamine oxidases (DAOs), also referred as histaminases [1], are homodimeric copper amine oxidases (EC 1.4.3.6), each subunit containing a single copper ion and 2,4,5-trihydroxyphenylalanine quinone/TPQ, a cofactor derived from the post-translational oxidation of a tyrosine residue [2]. They present a high specificity for primary diamines, able to oxidate biogenic amines to corresponding aldehyde, ammonia (NH_3), and hydrogen peroxide (H_2O_2). Current DAO assays in solution measure the amine oxidase activity by spectrophotometrical methods, monitoring directly the absorbance of formed aldehydes [3] or by subsequent condensation of different compounds [4]. Other methods are based on radiometric assays, with [1,4- ^{14}C] putrescine as substrate [5], on oxymetric or polarographic methods measuring the rate of oxygen consumption in the presence of substrate [6] or on fluorimetric determinations [7], where homovanillic acid is converted into a highly fluorescent compound by the released H_2O_2 in the presence of peroxidase. All these methods are not giving information on the loss of molecular integrity of DAO (i.e., to acidic or proteolytic hydrolysis). Thus, supplemental information can be obtained using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) by monitoring the protein pattern (staining gels with Coomassie Blue) and the enzymatic activity (zymography).

There are several major advantages of polyacrylamide (PAA) gels, such as: the high homogeneity of the gels with the density which can be easily modified to allow the best enzymes separation. The gels can be stained with Coomassie Brilliant Blue for protein profile and, keeping the same running conditions, a zymographic pattern can be directly visualized in some specific conditions and the enzyme activity can be quantified by densitometry. The zymographic PAGE is easy to run and the results are highly reproducible. As the H_2O_2 is the product of almost all oxidases, the gel areas occupied by DAO after its electrophoretic separation can be visualized via a coupled peroxidase reaction. Peroxidase as second enzyme is widely used to detect oxidase producing H_2O_2 in presence of oxidizable dyes as its second substrate. Frequently used

as donor substrate of peroxidase are: tetramethyl benzidine [8], 3,3'-diaminobenzidine [9], *ortho*-dianisidine [10], guaiacol [11]. The chromogenic guaiacol method is one of the most commonly used on gels. However, this method has the disadvantage that the bands are stable only for a short period, requiring stabilization by Coomassie Brilliant Blue [11]. Similarly, the 3,3'-diaminobenzidine may also be used as a peroxidase chromogenic substrate, but developed bands have to be intensified by other treatments [9].

Some previous reports concern amineoxidases staining on PAA gels. Thus, Houen and Leonardsen [12] developed a specific staining method for DAO activity in the presence of peroxidase. The diaminobenzidine inhibited DAO and gave rise to unspecific staining, the most suitable among the substrates used being 4-Cl-1-naphthol. Lee et al. [13] used a peroxidase-coupled reaction in the presence of 3-amino-9-ethylcarbazole to detect plasma amineoxidase activities after native polyacrylamide gel electrophoresis. In the mentioned studies, after the electrophoresis, the gels were kept in the presence of peroxidase solution to detect amineoxidase enzymatic activities. This present study proposes a method to detect the DAO enzymatic activity from *Lathyrus sativus* seedlings using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with the peroxidase immobilized in the PAA gel. This method allowed the study of DAO stability to proteolysis in simulated gastro-intestinal conditions. To our knowledge, this is the first zymographic assay reported for vegetal histaminase in the presence of SDS using the second enzyme (peroxidase) immobilized in the PAA gel. In the presented method, we proposed the *ortho*-phenylenediamine (OPDA) as donor substrate of peroxidase, with the formation of a stable product, azo-aniline, easily monitored on gels. The redox dyes, once oxidized, change in color and some of them also in solubility (from soluble when reduced to insoluble when oxidized). In our case, in the presence of H₂O₂ and peroxidase, OPDA changed from colorless to a yellow-brown compound stable and easy to detect on the gel. The two coupled

enzymatic reactions to monitor the enzymatic activity of DAO on the SDS polyacrylamide gel containing entrapped peroxidase are:



In our approach, the peroxidase is entrapped into the SDS polyacrylamide gels during polymerization and the DAO samples are deposited onto the gels for electrophoresis. After the electrophoretic run, gels are placed in solutions of putrescine (DAO substrate) and OPDA (peroxidase substrate). Both substrates diffuse into the gel and yellow-brown bands are developed *in situ*, corresponding to enzymatic activity of DAO.

A histaminase (DAO) of vegetal origin, more efficient than that of animal origin, was proposed for the general treatment of histamine-related pathologic conditions, such as allergic and septic shock, allergic asthma, anaphylaxis, allergic rhinitis and conjunctivitis, urticaria and atopic dermatitis, in which the histamine is the principal chemical mediator [14]. Plant histaminase can be obtained from different vegetal sources and can be used as a crude extract or as a purified enzyme. As previously shown with other copper oxidases (such as ceruloplasmin and serum bovine amine oxidase), which presented antioxidant, cardiomodulatory and cardioprotective effects [15], vegetal DAO has beneficial effects in cardiac anaphylactic response [16] and in myocardial ischemia and reperfusion injury [17]. Plant histaminase has also some beneficial effects in asthma-like reaction [18], or in splanchnic artery occlusion/reperfusion injury [19]. As histamine and reactive oxygen species are involved in the pathophysiology of inflammatory bowel disease, hog kidney DAO had been intraperitoneally administrated on experimental ulcerative colitis in rats [20], and the DAO treatment positively modified the inflammatory reaction. Thus, it is also

expected that exogenous DAO could protect against oxidative damage [17-19], as reactive species also play an important role in inflammatory diseases. In this context, the vegetal DAO stability to proteolysis in the presence of digestive enzymes has to be known. A proteolysis study on a vegetal DAO purified from pea (*Pisum sativum*) seedlings was previously reported [21] in the presence of 0.01% pepsin (pH 2) and of 0.1% trypsin (pH 7.2). To our knowledge, there are no studies on vegetal histaminase in more acidic conditions (pH 1.2) and over longer periods in simulated intestinal fluid, in the presence of pancreatin (containing trypsin and other proteases, together with other various digestive enzymes such as amylase, lipase, ribonuclease) [22]. In this context, the aim of this work was also to study *in vitro* the behaviour of DAO from *L. sativus* seedlings extract to proteolytic action of digestive enzymes, in simulated gastric and intestinal conditions, using the zymographic assay described above.

Experimental

Materials

1,4-Diaminobutane dihydrochloride (putrescine), *ortho*-phenylenediamine dihydrochloride, peroxidase type I (from horseradish, 96 purpurogallin units/mg solid), Bradford Reagent, pepsin (from porcine gastric mucosa, 882 units/mg protein), and pancreatin (from porcine pancreas) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Acrylamide, *N,N'*-methylene-bis-acrylamide and protein molecular weight standards (Broad Range) were from Bio-Rad Laboratory (Richmond, VA, USA).

Preparation of vegetal extract from *L. sativus* seedlings and purification of DAO

The vegetal extract and the purified DAO from grass pea *L. sativus* seedlings were prepared as previously described [23], with minor modifications. Briefly, 500 g of freshly collected shoots of etiolated *L. sativus* seedlings were homogenized in a

Waring blender with 1 L of 30 mM NaH_2PO_4 (final pH 4.4), and then filtered. In these conditions, the DAO remains ionically linked to the insoluble fraction. The solid residue, mainly constituted by cell walls and vascular fibres, was washed with the same buffer and the enzyme was finally eluted from the solid residue with 500 mL of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7) and, then, centrifuged. The supernatant containing the DAO was lyophilized. The purification of DAO was done as previously described [23], onto a DE52-cellulose and a HiTrap SP Sepharose column.

Determination of protein concentration and of enzymatic activity of DAO preparations from *L. salivus* seedlings

Different concentrations of vegetal extract (1, 5, 10, 15, 25, 40 mg/mL) or of purified DAO (3 mg/mL) were kept for 2 h at 4 °C in phosphate buffer solution (PBS, pH 7.4) under agitation and then, filtered and rapidly frozen. Protein concentrations of the vegetal extract and of the purified DAO were determined by the method of Bradford [24], using bovine serum albumin as standard. The enzymatic activity of DAO was assayed spectrophotometrically with the same two coupled reactions as for zymography assay, in the presence of putrescine (30 mM) as substrate for DAO and of peroxidase as a second enzyme reaction, where OPDA is enzymatically oxidized into a colored compound (azo-aniline) by the released H_2O_2 . The incubation mixture contained 640 μL of PBS (10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4), 10 μL of peroxidase solution (0.1 mg/mL), 50 μL of OPDA solution (30 mM), 200 μL of putrescine solution (30 mM) and 100 μL of DAO samples of unknown concentrations. The mixtures containing PBS, peroxidase, OPDA, and putrescine were incubated for 5 min at 37 °C, and then, the DAO samples were added. The enzymatic reactions were incubated at 37 °C for 10 min, when 100 μL of HCl (4 M) were added and the final absorbance was read at 484 nm using a Beckman DU[®]-6 spectrophotometer. The standard curve was prepared with serial concentrations of H_2O_2 from 0 to 68 μM .

One enzymatic unit (EU) of DAO is defined as the amount of enzyme catalyzing the oxidation of 1.0 μ mole of putrescine per 10 min at pH 7.4, at 37 °C.

Proteolysis of DAO

DAO was incubated in simulated gastro-intestinal conditions, with and without pepsin in simulated gastric fluid (SGF) or with and without pancreatin in simulated intestinal fluid (SIF) [22]. Samples of 40 mg of vegetal extract powder were each incubated for 0, 5, 10, 15, 30, 60 and 120 min in 875 μ L SGF (pH 1.2), containing or not pepsin (0.32% powder with 882 units/mg protein). In parallel, the same amounts of vegetal extract (40 mg) were each incubated for 0, 1, 2, 4, 6, 8, and 10 h in 1 mL SIF (pH 6.8), containing or not pancreatin. The SIF containing pancreatin only was also incubated (as control) for the same periods of time as above. The incubations were done at 37 °C and 50 rpm using an incubator shaker (series 25D, New Brunswick Scientific Co., New Jersey, USA).

After each indicated SGF period, every SGF sample was neutralized with 125 μ L of 6.66% sodium bicarbonate solution and maintained under agitation for 2 h at 4 °C. Then, the neutralized SGF samples (final concentration, 40 mg/mL) were filtered and frozen. The SIF samples were only filtered and rapidly frozen. Purified DAO (3 mg/mL) was incubated only for 10 h in SIF containing pancreatin (pH 6.8, 37 °C and 50 rpm), then filtered and rapidly frozen.

The DAO standards were represented by the vegetal extract (40 mg/mL) or by the purified DAO (3 mg/mL) in PBS solution (pH 7.4). Both standards were kept for 2 h under agitation at 4 °C and then filtered and frozen.

All the samples of histaminase were run in SDS-PAGE under non-reducing conditions.

Peroxidase entrapment in polyacrylamide gels

For the enzymatic detection of DAO on gels via the peroxidase-coupled reaction, the peroxidase was entrapped in the PAA gels. Thus, during the 8% PAA resolving gels preparation, 1 mL of horseradish peroxidase (1 mg/mL) was added to the gel solutions prior to polymerization (final volume of 5 mL). Stacking gels contained no peroxidase. To verify the homogenous distribution of peroxidase in the polymerized gel, an 8% PAA resolving gel containing peroxidase (19.2 purpurogallin units) was electrophoretically tested for 1 h (room temperature, 120 V) with no samples loaded on it. Then, the gel was immersed in a staining solution containing equal volumes of H_2O_2 (30 mM) and OPDA (30 mM) and kept under weak agitation for 1 h. Another 8% PAA resolving gel, containing no entrapped peroxidase and no samples loaded on it, was treated in the same conditions (control).

Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

The DAO protein content and the enzymatic activity of the vegetal samples incubated in PBS or in simulated gastric and intestinal conditions were evaluated by SDS-PAGE, using the electrophoresis system Mini-Protean II (Bio-Rad). Each sample was run in two PAA gels: one with entrapped peroxidase for zymography and another peroxidase-free for protein pattern.

Thus, the samples of vegetal extract at different concentrations in PBS (1, 5, 10, 15, 25, 40 mg/mL), the neutralized SGF samples (40 mg vegetal extract/mL in SGF, with or without pepsin), the SIF samples (40 mg vegetal extract/mL in SIF, with or without pancreatin) and the samples of purified DAO (3 mg/mL in SIF with pancreatin), prepared as described above, were defrosted and treated (1:1, v/v) with SDS electrophoresis sample buffer containing 0.12 M Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS (138 mM), 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue and no beta-mercaptoethanol. The

mixtures were not heated. Then, 30 μL of each treated sample were loaded and resolved by SDS-PAGE for 1 h and 15 min (room temperature, 120 V) on 8% PAA peroxidase-free gels for Coomassie Blue staining of proteins or on 8% PAA gels containing entrapped peroxidase (19.2 purpurogallin units) for zymographic revelation of DAO enzymatic activity. The electrophoresis buffer used in electrophoresis runs contained 0.025 M Tris-Base, 0.192 M glycine, and 0.1% SDS.

The molecular weight protein standards were diluted in SDS reducing sample buffer (with beta-mercaptoethanol), heated for 5 min at 95 °C, then cooled and loaded 10 μL /well to the PAA gel, as indicated in specifications from Bio-Rad.

Coomassie Blue protein staining

After electrophoresis, the 8% PAA gels were incubated for 30 min (mild agitation) in a fixation solution containing methanol:acetic acid:water (50/10/40, v/v/v) followed by 1 h of staining with 0.5% Coomassie Brilliant Blue G-250 in a methanol:acetic acid:water (40/10/50, v/v/v) solution.

Detection of DAO enzymatic activity on polyacrylamide gels

After electrophoresis, the PAA gels containing entrapped peroxidase and electrophoretically separated DAO samples, were rinsed with distilled water and placed in a solution of putrescine (30 mM) for a few minutes. Then, the incubation medium was completed with an equal volume of OPDA solution (17 mM). The DAO enzymatic activity was detected on PAA gels (zymographic bands) in function of newly produced substrate (H_2O_2) and in saturating concentration of chromogenic substrate (OPDA). Each substrate solution was prepared in PBS (pH 7.4) and kept at 4 °C before utilization. The gels immersed in the two mentioned solutions were

incubated at 37 °C (1 h) under dark conditions and weak agitation. The position of DAO enzymatic activity bands on gels (zymograms) was determined by comparison of the electrophoretic patterns obtained from Coomassie staining, using DAO in PBS solution (pH 7.4) as standard. The densitometry image analysis of gel bands was carried out using the *Quantity One* program (Bio-Rad). The DAO enzymatic activity measured by densitometry of bands was correlated with the DAO initial enzymatic activity (DAO in PBS, pH 7.4), spectrophotometrically determined. The DAO percentages were reported to standard, considering the standard (DAO in PBS, pH 7.4) as 100%.

Influence of SDS on the enzymatic activity of DAO

The estimation of the DAO enzymatic activities monitored on the zymographic gels (EU/electrophoretic load of 30 μ L, in the presence and the absence of SDS) and the dependence of DAO specific enzymatic activity on the time of incubation with SDS was studied spectrophotometrically at 25 °C, in the same conditions as for electrophoresis. Thus, samples of vegetal extract in PBS (1, 5, 10, 15, 25, 40 mg/mL) were treated (1:1, v/v) with an electrophoresis buffer containing 0.12 M Tris-HCl (pH 6.8), 20% glycerol, in the presence or the absence of 4% SDS (138 mM), for the determination of the DAO enzymatic activities as EU/electrophoretic load of 30 μ L. The dependence of DAO specific enzymatic activity on the time of incubation was studied after 0, 30, 75, and 135 min at 25 °C, on a sample of 40 mg vegetal extract/mL, in the same electrophoresis buffer and in the presence or in the absence of SDS. The DAO enzymatic activities were determined by the same spectrophotometrical method described above, using the two coupled reactions in solution.

Results and discussion

The protein content of *L. sativus* vegetal extract, determined by Bradford assay [24], was in a linear dependency ($R^2=0.9978$) with the vegetal extract concentrations (1, 5, 10, 15, 25, 40 mg/mL), indicating a good homogeneity of the extract powder (data not shown). The same concentrations of vegetal extract as mentioned above (with a total protein content of 15 ± 1.4 $\mu\text{g/mL}$, 132 ± 8 $\mu\text{g/mL}$, 302 ± 13 $\mu\text{g/mL}$, 435 ± 17 $\mu\text{g/mL}$, 719 ± 33 $\mu\text{g/mL}$ and, respectively, $1,091\pm27$ $\mu\text{g/mL}$) were then used on electrophoretic gels to follow the DAO protein content (Coomassie coloration) and the DAO enzymatic activity (zymography). The same migration patterns of molecular weight standards and of vegetal extract were obtained for either gels containing or not entrapped peroxidase after Coomassie coloration (data not shown). Thus, throughout the whole study, we used gels containing entrapped peroxidase only for the enzymatic activity evaluation of DAO (zymography).

To our knowledge, this is the first zymographic assay for plant histaminase with the second enzyme (peroxidase) entrapped into the PAA gel. As a control, after an electrophoresis run without any DAO-loaded samples, the PAA resolving gel, containing entrapped peroxidase, was colored in a few minutes and in a homogenous manner in the presence of H_2O_2 and OPDA solutions. This indicated that the entrapped peroxidase still kept its enzymatic activity and that it was uniformly distributed in the PAA resolving gel. The gel without entrapped peroxidase, kept under the same conditions as above, remained totally transparent even after 1 h of incubation (data not shown). There are lots of applications with peroxidase physically entrapped in gels. In our case, the enzyme was immobilized during polymerization of PAA gels (a covalent immobilization during the polymerization process of acrylamide gels involving double bonds of the prosthetic group of peroxidase is not excluded). Thus, despite the molecular weight of peroxidase (40 kDa), much lower than that of DAO from *L. sativus* (approximately 150 kDa), peroxidase did not migrate during the electrophoresis run, suggesting its immobilisation into the PAA gel during the polymerization process,

a fact also reported by Ugarova et al. [25], who studied the catalytic properties and stability of immobilized horseradish peroxidase into a PAA gel.

It is known that in denaturing SDS-PAGE, migration of proteins is determined primarily on their molecular mass. A single band in reducing SDS-PAGE corresponding to a molecular mass of 72 kDa [23] was reported for DAO from *L. sativus*. In non-reducing SDS-PAGE (without beta-mercapthoethanol and without heating of samples, which both can disrupt the folded structure of enzyme), the electrophoretic mobility of proteins depends more on their hydrodynamic size. Thus, the SDS-PAGE pattern of the analysed vegetal extract presented a major protein band, identified as DAO, whose growing intensity was in function of the concentration of the loaded vegetal extract (Fig. 1a). Gel images were densitometrically analysed using the *Quantity One* program and a linear variation of histaminase content (protein band intensity) with the concentrations of vegetal extract was obtained (Fig. 1b). The combination of SDS-PAGE protein pattern (Coomassie staining) and of zymogram technique allowed to determine comparatively the position of zymographic bands corresponding to DAO enzymatic activity (Fig. 1c). The H_2O_2 , the product of enzyme reaction of DAO and substrate for peroxidase, will generate, in the presence of OPDA dye (second substrate for peroxidase), a colored oxidized product (azo-aniline) with intensity related to the amount of released H_2O_2 resulted from DAO enzyme activity. The oxidized product of the two coupled enzymatic reactions is thus constantly accumulated on the gel. In all cases, the zymograms revealed only a single yellow-brown band on a colorless background, attributed to the DAO activity of histaminase, with intensity of bands growing in function of the concentration of vegetal extract, showing a linear dependency (Fig. 1d). Normally, the SDS contributes to unfold an enzyme by interacting with the non-polar amino acid side-chains situated in the interior of the folded protein structure. In our non-reducing conditions (without beta-mercaptoethanol and without heating of samples), the DAO still retained its enzymatic activity in the presence of SDS, a linear dependency being obtained between DAO

enzymatic activity (EU/electrophoretic load) and the concentrations of the vegetal extract, either in the presence or the absence of SDS (Fig. 1e).

The SDS is known to interact with most of water soluble proteins to form protein-detergent complexes [26]. Many enzymes loose their activity in the presence of SDS and some are activated [27, 28]. Gebicka [29] showed that horseradish peroxidase in solution is relatively resistant against SDS, the enzyme retaining its full activity up to 20 min when incubated at room temperature with 100 mM SDS, and still retained 63% of its activity after the next 4 h. To our knowledge, there are no studies on vegetal histaminase in the presence of SDS. Since in our case, it was observed that DAO still retained part of its enzymatic activity on PAA gels in the presence of SDS (Fig. 1c-e), it was of interest to study the stability of vegetal DAO in solution in the presence of SDS, using the same conditions as for electrophoresis. Thus, in the absence of SDS, the enzymatic activity of DAO was kept constant during the first 30 min of incubation (25 °C), and then, its activity significantly diminished (Fig. 2). In the presence of 69 mM SDS, the DAO specific activity was rapidly reduced, but then being stabilized for the entire period of 135 min of incubation in SDS (Fig. 2). This stabilization of the enzymatic activity in the presence of SDS for more than 2 h is important, since the revelation of enzymatic activity of DAO on PAA gels was done after 75 min of electrophoresis and during 60 min of gel incubation. The decrease of DAO enzymatic activity by SDS was also settled as percentage from the original DAO specific activity (in the absence of SDS), which was considered as 100%. Thus, 30% of DAO enzymatic activity was still detected after 135 min of incubation in the presence of SDS. The presence of SDS in the electrophoresis conditions (SDS-PAGE) contributed to a better resolution of DAO separation comparatively to native PAGE (data not shown), improving mobility and stabilizing the DAO.

The behaviour of DAO from *L. sativus* seedlings extract (40 mg vegetal extract/mL containing $1,091 \pm 27$ µg total protein/mL) to proteolytic action of digestive enzymes

was studied in SGF (with or without pepsin) and in SIF (with or without pancreatin) [22]. Thus, DAO electrophoretic bands corresponding to its protein content and its enzymatic activity were revealed on electrophoretic gels for DAO in PBS (pH 7.4) and in neutralized SGF (with or without pepsin), at 0 min of SGF treatment (Fig. 3). In acidic conditions (pH 1.2), the degradation and inactivation of DAO (with no detectable DAO enzymatic activity on gels) were observed after 15 min of incubation at 37 °C and 50 rpm (Fig. 3a, b). The pH of an enzyme medium can affect the state of ionization of amino acid side-chains that may be involved in the maintenance of the folded structure. Furthermore, in strong acidic conditions (pH 1.2), a possible hydrolysis can also occur with the degradation of the proteins contained in the vegetal extract (Fig. 3a). Federico et al. [21] reported that at pH 2 and in the presence of pepsin (0.01%, 4,500 units/mg), purified histaminase from pea seedlings (*P. sativum*) was partially inactivated after 30 min of incubation (14% remaining enzymatic activity), with complete loss of activity after 60 min of incubation. In more acidic conditions (pH 1.2) and in the presence of pepsin (0.32% with 882 units/mg protein) [22], the total degradation of all the proteins present in the vegetal extract from *L. sativus* seedlings was observed after 15 min of incubation (Fig. 3c), with no detectable DAO enzymatic activity (Fig. 3d). The remaining band found for samples incubated at 15, 30, 60, and 120 min corresponds to pepsin which is stable in gastric acidity (Fig. 3c).

The time course in SGF, in the absence or in the presence of pepsin, indicated a fast degradation of DAO in early stage of incubation (Fig. 3e,f). Thus, after 5 min of acidic incubation, a loss of about 10% of DAO content and of 15% of DAO activity detected on gels was observed. At 10 min, the degradation of DAO was more advanced, and, after 15 min, its degradation was almost complete. In the presence of pepsin, the DAO degradation was even faster, with total loss of its enzymatic activity in less than 10 min.

Previous proteolysis studies with other amine oxidases, such as swine kidney diamine oxidase (SKDAO) and bovine serum amine oxidase (BSAO), were done separately with trypsin, pronase, or with thermolysin for a period of up to 4 h [30]. The SKDAO in the presence of trypsin or pronase partially lost its enzymatic activity in the first 60 min, followed by stabilization during the next 3 h of proteolysis. In the case of trypsin, the SKDAO activity was stabilized at about 50% after 4 h of hydrolysis. In the presence of thermolysin, the SKDAO lost more than 60% of its initial activity after 4 h of proteolysis. Concerning the BSAO, the pronase exerted the highest denaturing effect, with only 40% remaining enzymatic activity after 4 h of hydrolysis. There are not many studies on vegetal histaminase stability to proteolysis in the presence of pancreatic enzymes. Federico et al. [21] tested purified vegetal histaminase from *P. sativum* seedlings only for 60 min in the presence of trypsin, when 67% of its enzymatic activity was retained. In our study, pancreatin, containing enzymes such as trypsin, chymotrypsin, endopeptidases, exopeptidases, carboxypeptidases, as well as other digestive enzymes (amylase, lipase, ribonuclease), was used to test the proteolysis stability of DAO from *L. sativus* over longer periods, up to 10 h. During 10 h of vegetal extract incubation in pancreatin-free SIF (pH 6.8) at 37 °C and 50 rpm, the DAO protein content was kept constant as indicated after Coomassie Blue staining (Fig. 4a), with a slight diminution of its enzymatic activity on the corresponding zymogram (Fig. 4b). Interestingly, in the presence of pancreatin, in the same conditions as before (SIF, pH 6.8), the DAO from the vegetal extract was still present after 10 h of incubation, as indicated by Coomassie protein staining (Fig. 4c). The corresponding zymogram still showed a band ascribed to DAO enzymatic activity even after 10 h of incubation in the presence of pancreatin (Fig. 4d), indicating a certain stability of DAO to pancreatin proteolysis. As control, SIF containing pancreatin only was spectrophotometrically checked for amine oxidase, and no activity was found over the 10 h of incubation (data not shown). This confirms the lack of additional interfering amine oxidases due to eventual microbial contamination during the long incubation. The densitometric analysis (Fig. 5) confirmed that the DAO protein content was almost

constant either in the absence or presence of pancreatin, with a slight decrease in the presence of pancreatin (Fig. 5a). After 10 h of incubation at 37 °C (50 rpm), the DAO activity from the vegetal extract was 44.7% in SIF without pancreatin and 13.6% in the presence of pancreatin (Fig. 5b).

To evaluate the influence of the presence of the other proteins from the *L. sativus* vegetal extract on DAO proteolysis, a purified DAO preparation (containing 413 ± 9 µg protein/mL with a specific enzymatic activity of 110.43 ± 2.01 EU/mg protein, determined in the presence of SDS) from the same vegetal source was also tested for 10 h (37 °C, 50 rpm) only in the presence of pancreatin (SIF, pH 6.8). The densitometric analysis of purified DAO protein content and of its enzymatic activity was realized, considering the purified DAO in PBS (pH 7.4) as standard (100%). After 10 h of incubation in the presence of pancreatin, the protein content of purified DAO diminished to 59.7% (data not shown), more than in the case of DAO from vegetal extract, which decreased to 78.7% after 10 h (Fig. 5a), suggesting a higher susceptibility at proteolysis of the purified histaminase samples. Concerning the DAO enzymatic activity, after 10 h of incubation in the same conditions as before, only 4.65% of purified DAO activity was still present (data not shown), comparatively to 13.6% obtained with the vegetal extract (Fig. 5b). These results suggest a possible protection of DAO afforded by the other proteins present in the vegetal extract or a possible presence of some protease inhibitors in the vegetal extract able to partially protect the DAO against pancreatin proteolysis. The elucidation of these aspects, explaining better stability to proteolysis in the case of the vegetal extract, will be the object of a further investigation.

Conclusion

A zymographic method was developed for the monitoring of DAO activity on immobilized peroxidase in polyacrylamide gels, with putrescine as substrate of DAO and OPDA as second substrate for peroxidase. Combination of protein pattern obtained in SDS-PAGE with that of enzymatic activity obtained in zymography can give valuable information on protein stability and enzymatic activity of DAO. Furthermore, a correlation between the DAO content and of its enzymatic activity from a vegetal extract can be established in different conditions (i.e., proteolysis). The data obtained by this method indicated a certain stability at proteolysis of vegetal DAO, an aspect which can be of interest for eventual therapeutic application of this enzyme. This method can also be used on native PAGE gels, as an alternative method to evaluate the DAO enzymatic activity.

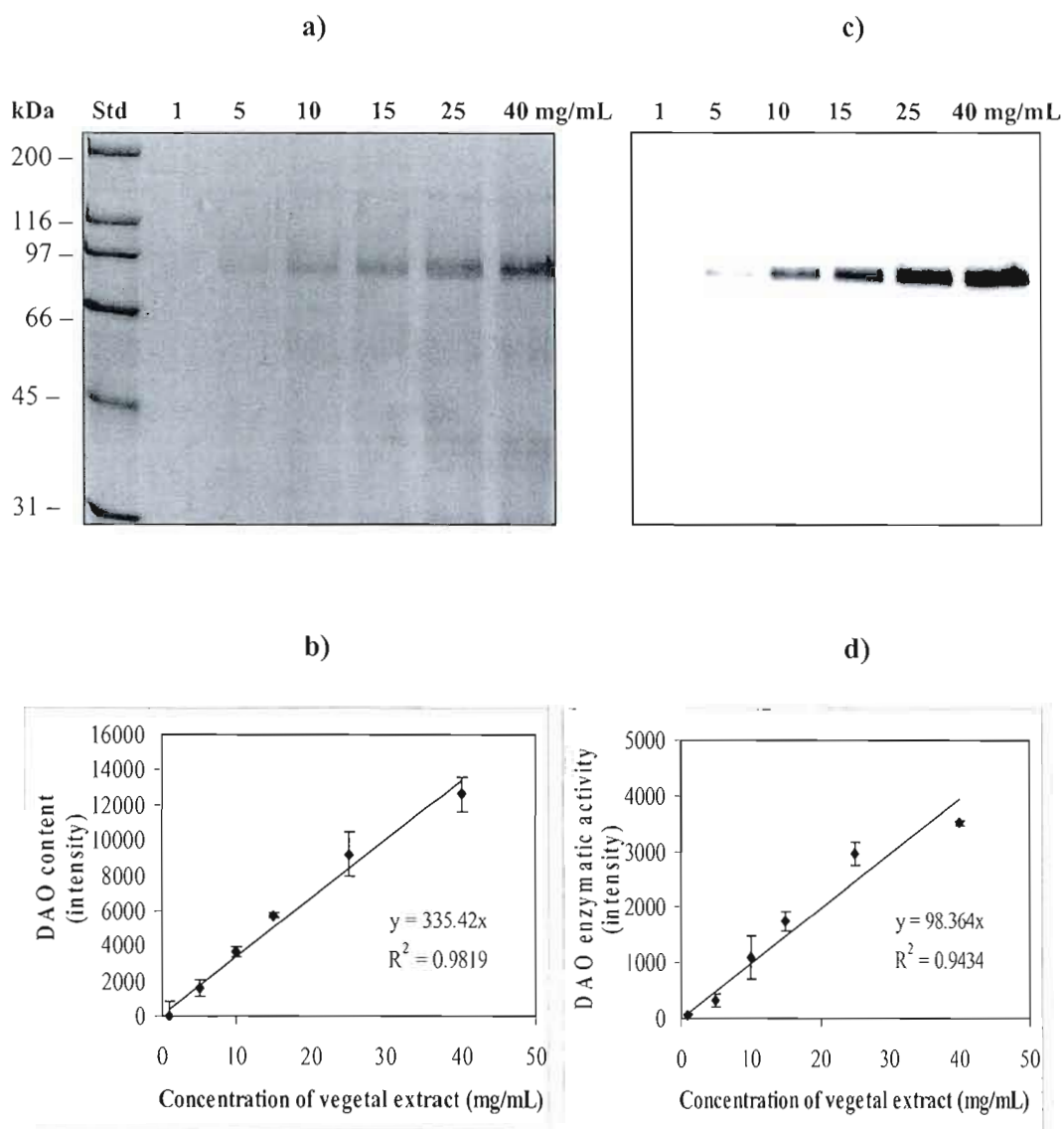
Acknowledgments

The graduate studentship from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) granted to Carmen Calinescu and support from CRIP (FQRNT) are gratefully acknowledged. Thanks are due to Dr. Canh LeTien for useful discussions.

References

1. Mondovi B, Rotilio G, Finazzi A, Scioscia-Santoro A (1964) *Biochem J* 9:408-415
2. Klinman JP, Mu D (1994) *Ann Rev Biochem* 6:299-344
3. Tabor CW, Tabor H, Rosenthal SM (1954) *J Biol Chem* 208:645-661
4. Holt A, Sharman DF, Baker GB, Palcic MM (1997) *Anal Biochem* 244:384-392
5. Kusche J, Richter H, Hesterberg R, Schmidt J, Lorenz W (1973) *Agents Actions* 3:148-156
6. Befani O, Sabatini S, Mateescu MA, Mondovi B (1989) *Biochem Biophys Res Commun* 163:1168-1174
7. Matsumoto T, Furuta T, Nimura Y, Suzuki O (1982) *Biochem Pharmacol* 31:2207-2209
8. Mesulam M-M (1978) *J Histochem Cytochem* 26:106-117
9. Iida R, Yasuda T, Nadano D, Kishi K (1990) *Electrophoresis* 11:852
10. Rudrappa T, Lakshmanan V, Kaunain R, Singara NM, Neelwarne B (2007) *Food Chem* 105:1312-1320
11. Fieldes MA (1992) *Electrophoresis* 13:454
12. Houen G, Leonardsen L (1992) *Anal Biochem* 204:296-299
13. Lee M-H, Chuang M-T, Hou W-C (2002) *Electrophoresis* 23:2369-2372
14. Mondovi B, Befani O, Federico R, Mateescu MA, Masini E, Mannaioni PF, Vannacci A (2002) *Int Patent Publ No: WO 2002/043745*
15. Mateescu MA, Nadeau R (2009) In: Floris G and Mondovi B (eds) *Copper amine oxidases: structures, catalytic mechanisms, and role in pathophysiology*. CRC
16. Masini E, Vannacci A, Marzocca C, Mannaioni PF, Befani O, Federico R, Toma A, Mondovi B (2002) *Biochem Biophys Res Commun* 296:840-846
17. Masini E, Pierpaoli S, Marzocca C, Mannaioni PF, Pietrangeli P, Mateescu MA, Zelli M, Federico R, Mondovi B (2003) *Biochem Biophys Res Commun* 309:432-439

18. Masini E, Vannacci A, Giannini L, Befani O, Nistri S, Mateescu MA, Mannaioni PF, Mondovi B, Federico R (2004) *Eur J Pharmacol* 502:253-264
19. Masini E, Cuzzocrea S, Bani D, Mazzon E, Muja C, Mastroianni R, Fabrizi F, Pietrangeli P, Marcocci L, Mondovi B, Mannaioni PF, Federico R (2007) *Shock* 27: 409-415
20. Fogel WA, Lewinski A (2006) *Inflamm Res* 55:S63-S64
21. Federico R, Befani O, Mondovi B, Mulhbach J, Mateescu MA (2000) *Inflamm Res* 49:S60-S61
22. U.S. Pharmacopeia National Formulary U.S.P. XXIV, NF XIX, United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD, 2000
23. Federico R, Cona A, Caliceti P, Veronese FM (2006) *J Control Rel* 115:168-174
24. Bradford MM (1976) *Anal Biochem* 72:248-254
25. Ugarova NN, Kershengol'ts BM, Artamonov ID, Berezin IV (1976) *Biokhimiia* 41:1662-1670
26. Ibel K, May RP, Kirschner K, Szadkowski H, Mascher E, Lundahl P (1990) *Eur J Biochem* 190:311-318
27. Schrock HL, Gennis RB (1977) *J Biol Chem* 252:5990-5995
28. Moore BM, Flurkey WH (1990) *J Biol Chem* 265:4982-4988
29. Gebicka L (1999) *Int J Biol Macromol* 24:69-74
30. Mondovi B, Befani O, Mateescu MA (1992) *Life Chem Reports* 10:151-155



e)

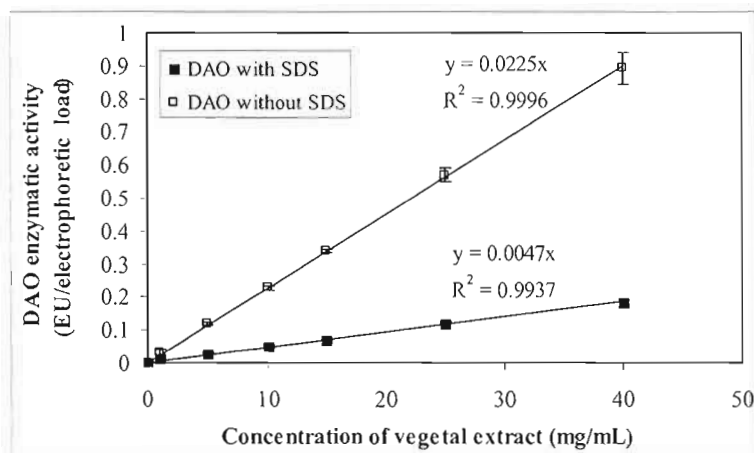


Fig. 1 Electrophoretic pattern of vegetal extract from *L. sativus* seedlings.

Coomassie staining: **a** SDS-PAGE (8% PAA resolving gel without peroxidase) of different concentrations of DAO vegetal extract (1, 5, 10, 15, 25, 40 mg powder/mL), treated (1:1, v/v) with non-reducing SDS loading buffer (30 μ L/well). The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue G-250. **b** Image analysis of DAO bands intensity with the *Quantity One* program. $n=3$.

Zymographic DAO enzymatic activities: **c** Different concentrations of DAO vegetal extract (1, 5, 10, 15, 25, 40 mg powder/mL), treated (1:1, v/v) with non-reducing SDS loading buffer (30 μ L/well). Oxidase activity was directly monitored on 8% PAA gels (containing entrapped peroxidase) after the electrophoretic run, in the presence of putrescine and *ortho*-phenylenediamine. **d** Image analysis of DAO bands intensity (enzymatic activity) with the *Quantity One* program. **e** Enzymatic activities of DAO on gel (EU/electrophoretic load of 30 μ L), spectrophotometrically determined, in function of the vegetal extract concentrations. Protein content of vegetal extract: 15 ± 1.4 μ g/mL (1 mg/mL), 132 ± 8 μ g/mL (5 mg/mL), 302 ± 13 μ g/mL (10 mg/mL), 435 ± 17 μ g/mL (15 mg/mL), 719 ± 33 μ g/mL (25 mg/mL), $1,091 \pm 27$ μ g/mL (40 mg/mL). $n=3$

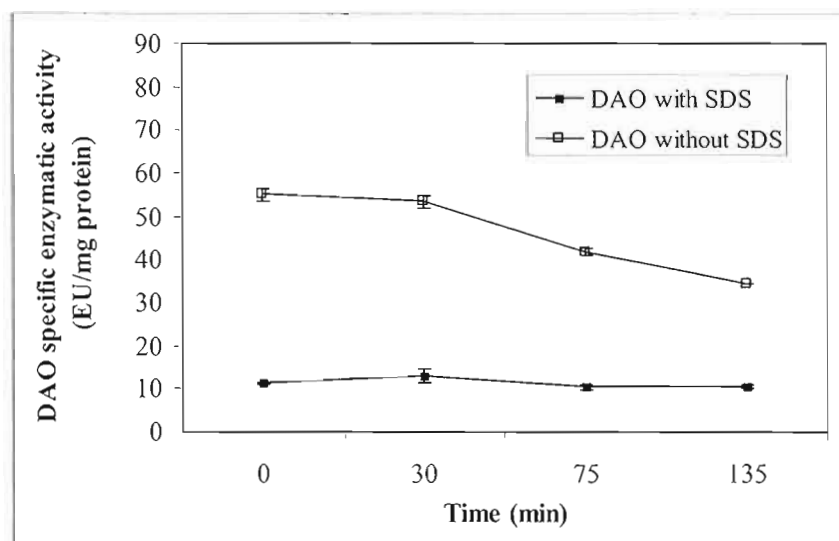
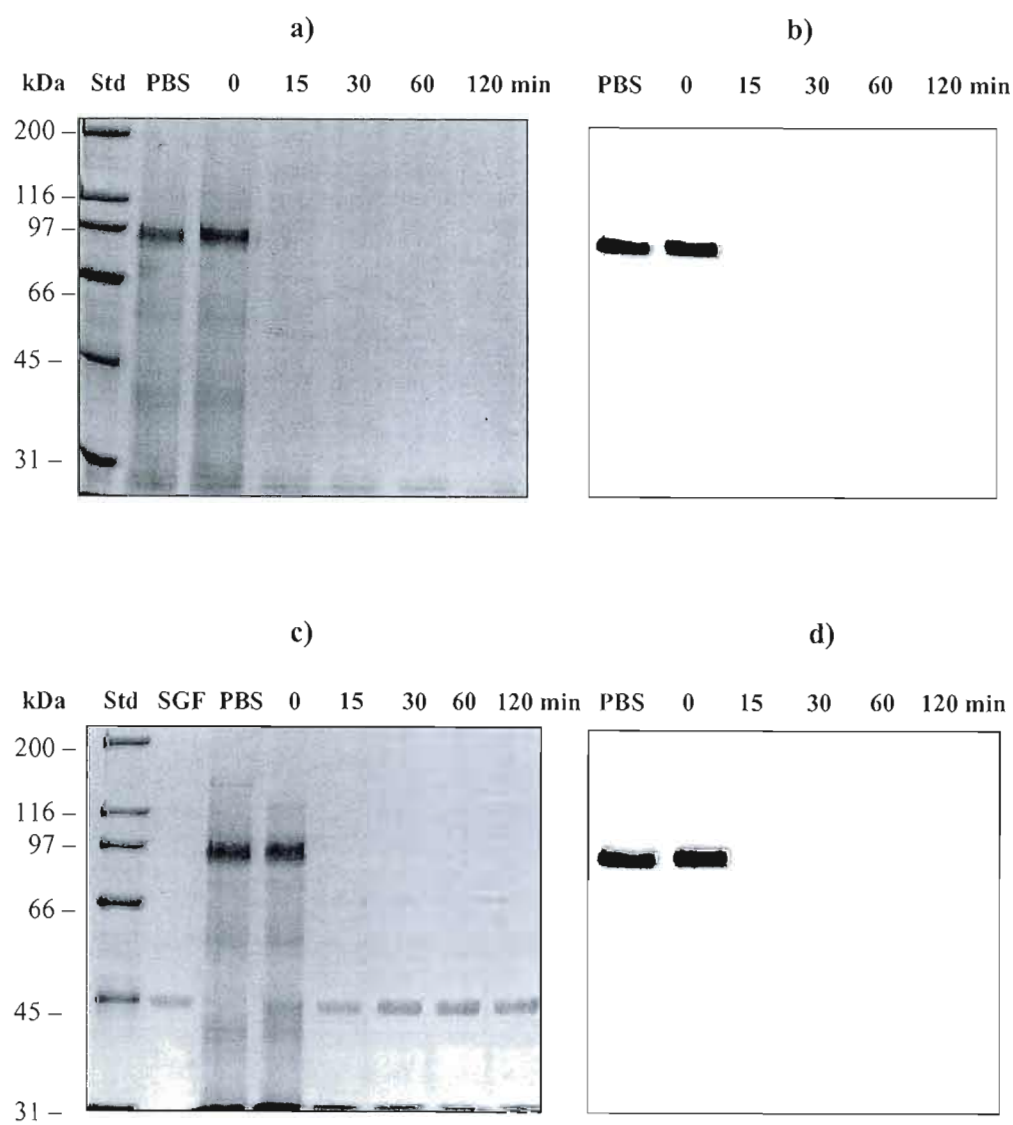


Fig. 2 The influence of sodium dodecyl sulfate on the enzymatic activity of DAO.

The specific enzymatic activity of DAO (EU/mg protein) from vegetal extract (40 mg/mL, containing $1,091 \pm 27$ μ g total protein/mL) was measured at 25 °C in a solution containing 60 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol, in the presence or the absence of 69 mM SDS. The DAO specific enzymatic activities were determined spectrophotometrically, as described before, with putrescine as DAO substrate and *ortho*-phenylenediamine as co-substrate for peroxidase. $n=3$



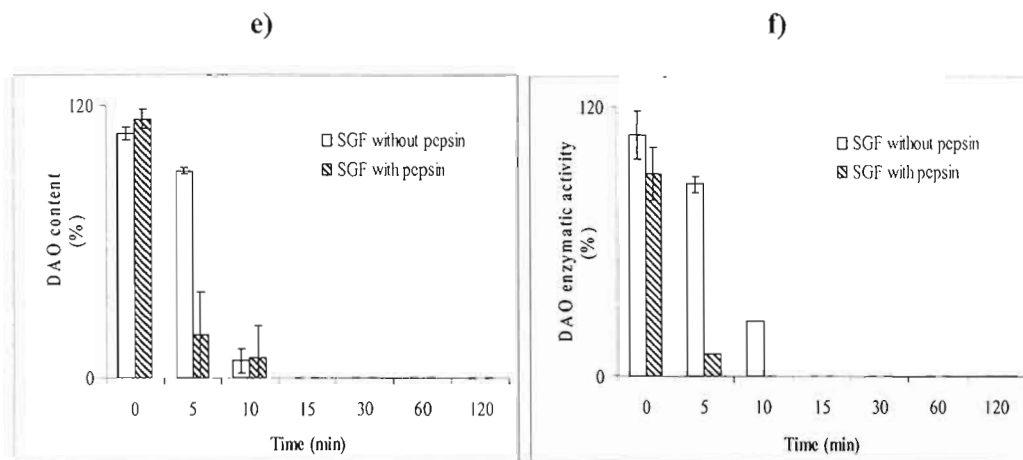


Fig. 3 Electrophoretic pattern of diamine oxidase from the vegetal extract of *L. sativus* seedlings in simulated gastric fluid (SGF, pH 1.2).

SGF without pepsin (a, b) and SGF with pepsin (c, d). Coomassie staining gels without peroxidase (a, c) and DAO zymographic gels containing entrapped peroxidase (b, d) of vegetal extract (40 mg/mL, containing $1,091 \pm 27 \mu\text{g}$ total protein/mL) from *L. sativus* seedlings in PBS, pH 7.4 and in SGF (up to 120 min of incubation). The vegetal extract samples in SGF (with or without pepsin) were neutralized with sodium bicarbonate, and then treated with non-reducing SDS loading buffer (1:1, v/v) and loaded 30 μL /well. DAO protein content (e) and DAO enzymatic activity (f) in SGF. Results are expressed in percentage, considering DAO in PBS as 100%. *Quantity One* program was used for densitometric analysis of gel images. The DAO specific enzymatic activity of $11.21 \pm 0.31 \text{ EU/mg}$ protein, determined spectrophotometrically in PBS solution (in the presence of SDS), was considered as 100%. $n=3$

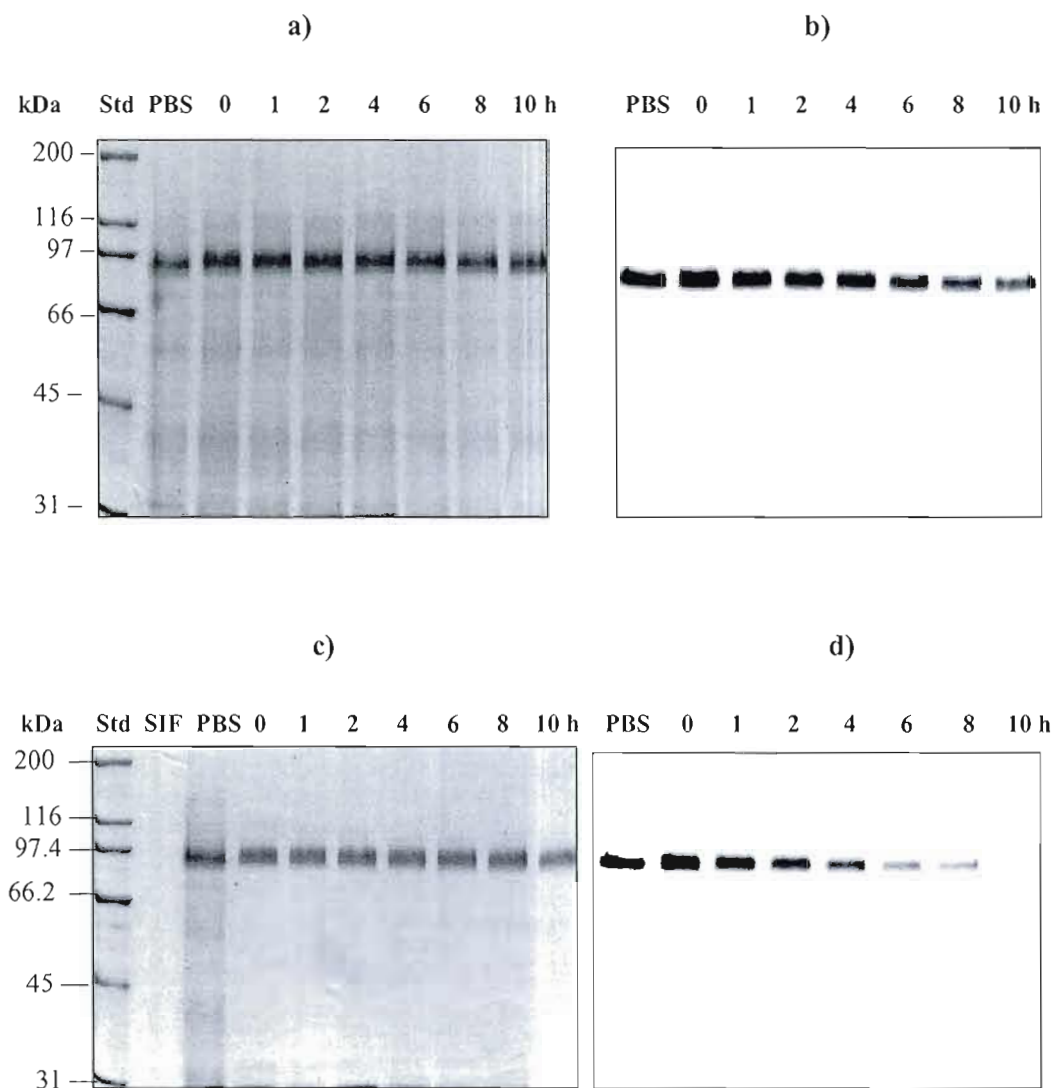


Fig. 4 Stability of diamine oxidase from *L. sativus* vegetal extract in simulated intestinal fluid (SIF, pH 6.8).

SIF without pancreatin (a, b) and SIF with pancreatin (c, d). Coomassie stained gels without peroxidase (a, c) and DAO zymographic gels containing entrapped peroxidase (b, d) of vegetal extract (40 mg/mL, containing $1,091 \pm 27$ μ g total protein/mL) from *L. sativus* seedlings in PBS, pH 7.4 and in SIF (up to 10 h of incubation). The vegetal extract samples in SIF (with or without pancreatin) were treated with non-reducing SDS loading buffer (1:1, v/v) and loaded 30 μ L/well. $n=3$

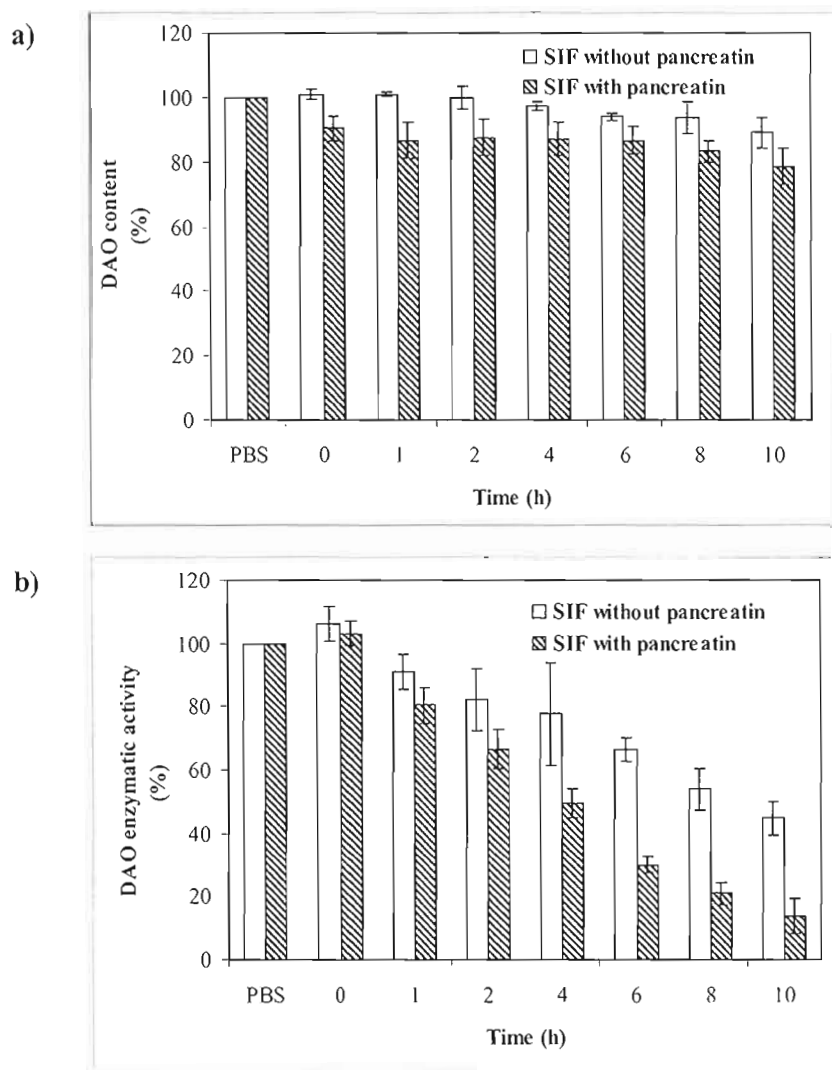


Fig. 5 Densitometric analysis of diamine oxidase from *L. sativus* vegetal extract after incubation in simulated intestinal fluid (SIF, pH 6.8), with or without pancreatin.

a DAO protein content (%), **b** DAO enzymatic activity (expressed in % from the specific activity of DAO in PBS). Results are expressed in percentage, considering DAO in PBS as 100%. *Quantity One* program was used for densitometric analysis of gel images. The vegetal extract (40 mg/mL) contained $1,091 \pm 27$ μ g total protein/mL in PBS/SIF. The DAO specific enzymatic activity of 11.21 ± 0.31 EU/mg protein, determined spectrophotometrically in PBS (in the presence of SDS), was considered as 100%. $n=3$

CHAPITRE VIII

MATRICES MONOLITHIQUES À BASE DE CARBOXYMÉTHYL AMIDON:CHITOSANE CONTENANT DIAMINE OXYDASE ET CATALASE POUR LIVRAISON INTESTINALE

Carmen Calinescu ¹, Bruno Mondovi ², Rodolfo Federico ³ et
Mircea Alexandru Mateescu ¹

¹ *Département de Chimie et Centre BioMed, Université du Québec à Montréal,
CP 8888, Succ. A, Montréal, Qc H3C 3P8, Canada*

² *Département des Sciences Biochimiques "Rossi-Fanelli",
Université de Rome "La Sapienza", 00185 Rome, Italie*

³ *Département de Biologie, Université de Rome 3, 00146 Rome, Italie*

Résumé:

Des formulations enzymatiques pour l'administration orale (comprimés monolithiques) à base de Carboxyméthyl amidon riche en amylose ("Carboxymethyl starch", CMS) et Chitosane, contenant un extrait végétal lyophilisé de germes de *Lathyrus sativus* avec une activité de diamine oxydase (PSDAO), la catalase, ou la PSDAO associée à la catalase comme principes actifs, ont été obtenues par compression directe des mélanges de poudres. Les comprimés à base de CMS:Chitosane (1:1), avec les deux enzymes formulées séparément, ont assuré une bonne protection gastrique de la PSDAO (charge de 30%) et de la catalase (charges de 3.3% - 50%). Ainsi, l'activité enzymatique résiduelle était de 75% pour la DAO et de plus de 80% pour la catalase après 60 min d'incubation dans le fluide gastrique simulé (SGF). Une activité enzymatique variable de la DAO libérée a été trouvée dans le fluide intestinal simulé (SIF), qui a été en fonction du temps de résidence du comprimé CMS:Chitosane (30% PSDAO) dans le SGF. Dans le cas de la catalase seule (charge de 10%) formulée avec CMS:Chitosane, plus de 50% de son activité enzymatique initiale a été enregistrée après 480 min dans le SIF. Pour des charges plus élevées, le pourcentage de l'activité enzymatique de la catalase libérée a été plus petit, probablement à cause des associations protéine-protéine au niveau du comprimé. En ce

qui concerne les formulations bi-enzymatiques (comprimés de CMS:Chitosane avec 20% PSDAO et 10% ou 20% catalase), une diminution apparente de l'activité enzymatique de la DAO libérée a été observée en utilisant la méthode avec la peroxydase couplée suite à la décomposition du peroxyde d'hydrogène (produit de l'activité de la DAO) par la catalase libérée presque en même temps que la DAO. Cette diminution apparente de l'activité de la DAO en présence de la catalase n'a pas été trouvée en utilisant la méthode de dosage de l'ammoniaque produit par DAO. L'association de la DAO à la catalase (qui décompose le peroxyde d'hydrogène), les deux enzymes co-formulées avec CMS et Chitosane, pourrait représenter une thérapie alternative pour le traitement des maladies intestinales.

**Carboxymethyl starch:Chitosan monolithic matrices containing
diamine oxidase and catalase for intestinal delivery**

Carmen Calinescu ¹, Bruno Mondovi ², Rodolfo Federico ³ and
Mircea Alexandru Mateescu ^{1*}

¹ *Department of Chemistry and Centre Pharmaqam, Université du Québec à Montréal,
CP 8888, Succ. A, Montréal (Québec) H3C 3P8, Canada*

² *Department of Biochemical Sciences "Rossi-Fanelli",
University of Rome "La Sapienza", 00185 Rome, Italy*

³ *Department of Biology, 3rd University of Rome, 00146 Rome, Italy*

** Corresponding author*

Tel.: +1 514 987 4319

Fax: +1 514 987 4054

E-mail address: mateescu.m-alexandru@uqam.ca

Abstract

Oral enzyme formulations (monolithic tablets) based on Carboxymethyl high amylose starch (CMS) and Chitosan excipients and loaded with grass pea seedlings diamine oxidase (PSDAO) vegetal extract, catalase, or PSDAO associated to catalase, as active principles, were obtained by direct compression of dry powders. The CMS:Chitosan (1:1) hydrophilic matrix afforded a good gastric protection to PSDAO (30% loading) and to catalase (3.3% - 50% loading), when both were formulated separately, with 75% DAO activity and more than 80% catalase remaining activity after 60 min of incubation in simulated gastric fluid (SGF). A variable enzymatic activity of released DAO was found in simulated intestinal fluid (SIF), which was in function of the residence time of CMS:Chitosan tablet (30% PSDAO) in the SGF. In the case of catalase formulated with CMS:Chitosan (10% loading), more than 50% of its initial enzymatic activity was found after 480 min in SIF, whereas, at higher loading, the percentage of released catalase activity was lower, probably due to protein-protein associations within the tablet. Concerning the bi-enzymatic formulations (CMS:Chitosan tablets containing 20% PSDAO and 10% or 20% catalase), an apparent decrease of DAO released enzymatic activity was observed when determined by the peroxidase coupled method, showing the decomposition of hydrogen peroxide (product of DAO activity) by catalase liberated almost in the same time as DAO. This decrease of DAO released activity in the presence of catalase was only apparent, since it was not found when the DAO enzymatic dosage was based on the ammonia by-product. The anti-inflammatory DAO associated to catalase (clearing the pro-oxidant hydrogen peroxide) and formulated with CMS and Chitosan excipients, could constitute a therapeutic approach in the treatment of intestinal diseases.

Keywords: Diamine oxidase vegetal extract, Catalase, Carboxymethyl high amylose starch, Chitosan, Oral tablet administration, Inflammatory bowel diseases.

Abbreviations: CMS, carboxymethyl starch; GDH, L-glutamate dehydrogenase; IBD, inflammatory bowel disease; KGA, *alpha*-ketoglutaric acid; MW, molecular weight; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; OPDA, *ortho*-phenylenediamine dihydrochloride; PSDAO, pea seedlings diamine oxidase; SGF, simulated gastric fluid; SIF, simulated intestinal fluid.

Introduction

The diamine oxidase (DAO, EC 1.4.3.6), also called histaminase [1], catalyses the oxidative deamination of histamine and other biogenic amines [2], with the release of the corresponding aldehydes, hydrogen peroxide (H_2O_2) and ammonia (NH_3). As previously shown with other copper oxidases, such as ceruloplasmin and bovine serum amine oxidase with antioxidant, cardiomodulatory, cardioprotective and antifibrillatory properties [3-6], a DAO of vegetal origin, with an enzymatic activity higher than that of the animal DAO, presents some beneficial effects in cardiac anaphylactic response [7] and in myocardial ischemia and reperfusion injury [8]. Plant histaminase was also proposed for the treatment of asthma-like reaction [9]. Recently, Masini *et al.* [10] showed that pea seedling DAO, when parenterally administered, may have protective effects on intestinal ischemia, by reducing local tissue inflammation through acceleration of histamine catabolism and by counteracting free radical-mediated tissue injury, with significant decrease in tissue levels of peroxidation and nitration products, of DNA damage and of ileal cell apoptosis.

The DAO is the main histamine degrading enzyme acting predominantly in the intestinal tract. The presence of DAO in the intestinal mucosa may induce a protection against the endogenous [11] or exogenous (food) histamine [12]. The enhancement of histamine content in humans could be due to various factors. Food-induced histaminosis can generate plasma histamine elevation and haemodynamic alterations, particularly when associated with low DAO activity [13]. A high histamine content in some food can become toxic, especially in the oriental food [14]. Elevated histamine content in food and beverages can also be associated to microbial contamination [15]. The mechanism of pseudo-allergic reactions of histamine caused by food seems to be mainly ascribed to an intestinal hyperpermeability (caused by irritant species as alcohol) or by decrease of DAO enzymatic activity. Since DAO is a major catabolic enzyme for histamine in humans, its lower mucosal level at the sites of inflammation would generate an accumulation of the released histamine, which may participate to

the induction and enhancement of acute inflammatory responses [16]. Thus, in the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD), mucosal alterations are frequently reflected in changes of mucosal DAO activity and, respectively, in mucosal histamine content [17]. In areas of macroscopically-inflamed tissue in IBD, the DAO activity is lower than in normal intestinal tissues [18]. The jejunal secretion of histamine was reported as higher in Crohn's disease and was significantly correlated with the Crohn's disease activity index [19]. High histamine content was also found in experimental neoplasias, such as colon carcinomas [20], and a direct relationship between DAO activity and tumor progression was shown [21]. A possible therapeutic effect of DAO in cancer could be thus envisaged because of the anti-neoplastic properties of amine oxidases [22-23]. During intestinal post-ischemic reperfusion, it was found a marked histamine release by the intestinal mucosa, and the activity of DAO was significantly reduced [24].

Another factor involved in the pathogenesis of intestinal inflammation is the oxidative stress that can amplify the intestinal inflammation by increasing mucosal and vascular permeability and recruitment and activation of more neutrophils, with higher release of free radicals and pro-oxidant species [25]. An important component of the endogenous defence against oxidative stress is represented by antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. Decreased antioxidant enzyme activities or an unbalanced expression of one of these enzymes may increase the vulnerability of cells to reactive oxygen species, hindering the recovery of the mucosa, as already reported in IBD [26]. Thus, to compensate the loss of antioxidant defence, treatments with antioxidants are required.

The information concerning the therapeutical effects of DAO on IBD is rather limited. Fogel and Lewinski [27] showed a possible therapeutic effect of hog kidney DAO, administered intraperitoneally, on a model of ulcerative colitis in rat, with a reduction of inflammatory reaction. Decreasing the histamine levels and the oxidative

stress in intestinal inflammation could be a promising therapeutic strategy to better manage the IBD. As for most oxidases, a by-product of the DAO enzymatic reaction is H_2O_2 , a pro-oxidant agent which can present desirable bactericidal and undesirable oxidative damaging effects. Catalase (EC 1.11.1.6) is an anti-oxidant enzyme that specifically catalyzes the decomposition of H_2O_2 . Due to its H_2O_2 scavenger capacity, catalase was proposed for use in post-ischemic reperfusion injury in myocardial infarction and stroke, burns, trauma, renal transplants, respiratory distress syndrome and broncho-pulmonary dysplasia [28], as parenteral formulations of the enzyme covalently bound to polyethylene glycol. We are now proposing an oral enzymatic therapy based on the association of grass pea seedlings diamine oxidase (PSDAO) with catalase for the treatment of various colon diseases. The PSDAO would control the levels of histamine and would have some anti-oxidant effects. When associated, catalase will particularly eliminate the H_2O_2 by-product of DAO, preventing the local intestinal oxidative stress. It was recently found that H_2O_2 exerts an inhibition of copper amine oxidases and that the catalase protects DAO from inactivation by H_2O_2 produced by DAO itself [29]. In our case, associated catalase not only will protect PSDAO, but, in addition, could generate more oxygen (O_2), a substrate of PSDAO, enhancing its efficiency. A major challenge is to deliver bioactive agents to colon without gastric or intestinal degradation during the gastro-intestinal transit of the oral dosages. The design of biodegradable intestinal delivery systems of therapeutic agents for different diseases, such as colon cancer, IBD, including Crohn's disease and ulcerative colitis, gained increasing interest. As colonic microflora produce a large number of degrading enzymes, several natural polysaccharides from algal (alginates), plant (pectin, guar gum), microbial (dextran, xanthan gum) or animal origin (chondroitin), have been investigated as carriers for colon-specific drug delivery. Chitosan, a polysaccharide consisting of β -(1-4)-linked 2-amino-2-deoxy-D-glucose, insoluble at the pH of intestinal fluids, appears as an interesting excipient for site-specific delivery to the colon due to its susceptibility to glycosidic hydrolysis by microbial enzymes in the colon [30]. The association of cationic Chitosan with other

biodegradable polymers, such as anionic CMS [31-32], could also represent an interesting way to deliver bioactive agents to the colon. Thus, recently, monolithic tablet based on a CMS:Chitosan hydrophilic matrix was proposed for colon delivery of small molecules [33] and probiotics [34]. Therefore, it was of interest to evaluate this CMS:Chitosan hydrophilic matrix for the formulation of bioactive agents such as PSDAO and/or catalase enzymes that could have a potential therapeutic role in the treatment of intestinal diseases.

Materials and Methods

Materials

High amylose starch (Hylon VII) was obtained from National Starch (Bridgewater, NJ, USA) and Chitosan (600 kDa, 92% degree of deacetylation) from Marinard Biotech (Rivière-au-Renard, Qc, Canada). Bromocresol green (sodium salt), 1,4-diaminobutane dihydrochloride (putrescine), *ortho*-phenylenediamine dihydrochloride (OPDA), peroxidase type I (from horseradish: 96 purpurogallin units/mg solid), ammonia assay kit, hydrogen peroxide (30%), Folin-Ciocalteu Reagent, pepsin (from porcine gastric mucosa: 882 units/mg protein), pancreatin (from porcine pancreas, USP specifications) and catalase (from bovine liver: 2950 units/mg solid; 4540 units/mg protein) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA). The other chemicals were reagent grade and used without further purification.

Preparation of diamine oxidase vegetal extract from seedlings of *Lathyrus sativus* (grass pea)

The grass pea seedlings vegetal extract (PSDAO) was obtained from 500 g of freshly collected shoots of etiolated *L. sativus* seedlings which were homogenized in a Waring blender with 1 L of 30 mM NaH_2PO_4 (final pH 4.4), and then filtered. The solid residue, mainly constituted by cell walls and vascular fibres, was washed with the

same buffer and the enzyme was finally eluted from the solid residue with 500 mL of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7) and, then, centrifuged. The supernatant containing the DAO was lyophilized, obtaining thus the DAO vegetal extract powder, hereto called PSDAO.

Carboxymethyl high amylose starch excipient synthesis

The CMS excipient was synthesized in alkaline medium, as previously described [32], using monochloroacetic acid as starch substitution agent. Practically, an amount of 70 g high amylose starch (Hylon VII) was suspended in 170 mL of distilled water and warmed at 50 °C under continuous stirring in a Hobart planetary mixer. A volume of 235 mL of an aqueous 1.45 M NaOH solution was added and the reaction medium was homogenized for 20 min at 50 °C for gelatinization. To transform the starch into a more reactive alkoxide form (and thus favorising the starch nucleophilic substitution), 55 mL of 10 M NaOH solution were also added to the reactional medium. Then, 45.5 g of monochloroacetic acid, dissolved in a minimum volume of water, were added to the starch and the reactional medium was kept for 1 h at 50 °C for the reaction of substitution. After 1 h, the gel-slurry was neutralized with an acetic acid solution and precipitated with acetone, and the salt ions were removed by several washings with acetone/water (60:40, v/v). Finally, the CMS gel-slurry was dried with acetone and kept overnight at room temperature.

The polymer powder was then sieved and particles with granulometry less than 300 μm were retained for the formulation study. Fourier transform infrared spectroscopy was used to detect the presence of carboxymethyl groups added. The degree of substitution (0.26) was determined by direct titration as previously described [32].

Preparation of Chitosan excipient

The powder of Chitosan was prepared as previously described [34], by dissolving the purchased Chitosan in an acetic acid solution (2%), followed by its filtration (to eliminate impurities). Then, a solution of NaOH (1 M) was added to the homogeneous filtrate until a pH of 6.5. The gel-slurry was precipitated with 100% acetone, well-washed with distilled water, and finally dried at room temperature. Excipient fraction smaller than 300 μm was retained for the preparation of monolithic tablets.

Fabrication of monolithic tablets

The powders of CMS and/or Chitosan excipients were well mixed with the bioactive agents (PSDAO and/or catalase powders) until homogenization. Flat-faced tablets of 300 mg were obtained by direct compression (2.5 T) of the powder mixtures using 9 mm cylinder outfits and a Carver press (Wabash, IN, USA). The PSDAO powder (30% loading) was formulated with CMS alone, CMS:Chitosan (1:1, *w/w*) or Chitosan alone. Catalase (3.3%, 10%, 20%, 50% loading) was formulated only with CMS:Chitosan (1:1, *w/w*). Tablets based on 100% enzymes (excipient-free) were also produced as control. Bi-enzymatic monolithic tablets, based on CMS:Chitosan (1:1, *w/w*) and containing simultaneously the two enzymes (PSDAO and catalase), were also realized with a constant loading of PSDAO (20%) and a variable loading of catalase (10% and 20%) per tablet.

Gastric stability of tablet formulations (with or without PSDAO or catalase)

Tablets of 300 mg, based on CMS:Chitosan (1:1) with 0% and 50% enzyme loading or on 100% enzyme (without excipients), and loaded with 5% bromocresol green (15 mg pH indicator per tablet), were prepared as previously described. Every tablet was incubated 60 min in 50 mL of SGF [35] at 37 °C and 50 rpm (incubator

shaker - series 25D, New Brunswick Scientific Co., NJ, USA). The tablet integrity and color modifications were noticed on the whole and on cross-sectioned tablets.

Stability of enzyme formulations in simulated gastric fluid

Tablets based on CMS alone, CMS:Chitosan (1:1) or Chitosan alone (as excipients), containing 30% PSDAO (as active principle ingredient), were incubated for 0, 30, 60, 120 min in 50 mL SGF, pH 1.2, with pepsin [35], at 37 °C and 50 rpm using the incubator shaker as before. Also, the CMS:Chitosan formulations containing catalase only (different loadings) or the two enzymes (PSDAO:Catalase) were incubated for 60 min in SGF (in the same conditions as before). The remaining enzymatic activities in the tablets were determined after the incubation times indicated above by crushing the tablets in 50 mL of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), followed by sample filtration.

Enzyme delivery in simulated intestinal fluid

The tablet formulations containing PSDAO only, catalase only or the two enzymes were first incubated in SGF for the same incubation times indicated above. After SGF incubation, tablets were individually transferred into 50 mL SIF, pH 6.8, with pancreatin [35] and incubated at 37 °C and 50 rpm (total dissolution time of 24 h), using the same incubator shaker. Samples of 1 mL were prelevated from SIF after regular intervals of time, filtered and the DAO and catalase enzymatic activities were determined.

Evaluation of DAO enzymatic activity in the presence of catalase

PSDAO:Catalase powders at different weight ratios (6:1, 2:1, 1:1) were dissolved in 50 mL phosphate buffer solution (50 mM, pH 7.0), kept 120 min under agitation at 4

°C and filtered prior to determine the DAO enzymatic activity in the absence or in the presence of catalase.

Determination of DAO enzymatic activity

a) Enzymatic assay of DAO with the peroxidase coupled reaction (specific for released H_2O_2). The DAO enzymatic activity was spectrophotometrically assayed with a peroxidase coupled reaction, in the same conditions as previously described [36]. Briefly, the reactional mixture containing 640 μ L of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 10 μ L of peroxidase solution (0.1 mg/mL), 50 μ L of 30 mM OPDA solution and 200 μ L of 30 mM putrescine solution was incubated for 5 min at 37 °C and then, 100 μ L of DAO samples were added to start the dosage. The enzymatic reactions were conducted at 37 °C for 10 min, when 100 μ L of HCl (4 M) were added and the final absorbance was read at 484 nm using a Beckman DU[®]-6 spectrophotometer. The standard curve was prepared with serial concentrations of H_2O_2 from 0 to 68 μ M.

b) Enzymatic assay of DAO with the L-Glutamate dehydrogenase (GDH) coupled reaction (specific for released NH_3). In the particular case of the association of DAO with catalase, the DAO assay via peroxidase cannot apply due to decomposition of H_2O_2 by the associated catalase. For these cases, the DAO enzymatic activity was also evaluated using an ammonia assay kit (Sigma-Aldrich), where NH_3 released from the putrescine substrate (under DAO catalysis) reacts with *alpha*-ketoglutaric acid (KGA) and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) in the presence of GDH. The reactional mixture containing 1 mL of assay kit reagent (KGA and NADPH), 200 μ L of 30 mM putrescine solution, 10 μ L of GDH (kit reagent) was incubated for 5 min at 37 °C and, finally, 100 μ L of DAO samples (containing or not catalase) were added. The enzymatic reactions were conducted at 37 °C for 10 min, monitoring the decrease of absorbency at 340 nm. Since catalase also strongly binds

NADPH in its active center, the catalase interference was subtracted from each determination of DAO enzymatic activity.

One enzymatic unit (EU) of DAO was defined as the amount of enzyme catalyzing the oxidation of 1.0 μ mole of putrescine per 10 min at pH 7.0 and 37 °C.

For CMS, CMS:Chitosan (1:1) and Chitosan formulations containing 30% PSDAO only, the DAO enzymatic activity was determined by the peroxidase coupled assay.

For the formulations based on CMS:Chitosan (1:1) and containing 20% PSDAO and different loadings in catalase (0%, 10% and 20%), the DAO enzymatic activity was determined by the peroxidase coupled assay and by the GDH coupled assay.

The DAO enzymatic activity of vegetal extract powder (PSDAO) and of different weight ratios of PSDAO:Catalase powders, was also evaluated by the two enzymatic reactions, as proposed before.

Determination of catalase enzymatic activity

The enzymatic activity of catalase was determined spectrophotometrically (Beckman DU[®]-6) by monitoring at 240 nm the H₂O₂ decrease during catalysis [37]. The reactional medium contained: 2.9 mL of H₂O₂ (0.036%) prepared in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and 0.1 mL of filtered sample containing catalase.

One enzymatic unit (EU) of catalase is defined as the amount of enzyme decomposing 1.0 μ mole of H₂O₂ per minute at pH 7.0 and 21 °C, while the H₂O₂ concentration falls from 10.3 mM to 9.2 mM.

Protein concentrations of the PSDAO and of catalase powders were determined by the method of Lowry [38], using bovine serum albumin as standard.

Results

Gastric stability of tablet formulations (with or without PSDAO or catalase)

To evaluate the pH within the tablets, the test with a pH indicator is useful because it indicates to what extent the excipients can protect the active agent(s) in SGF following the color change of the pH indicator (*i.e.*, for bromocresol green pH indicator, the color changes from blue, over pH 5.4, to yellow-orange, below pH 3.8). Thus, to the air, before incubation in SGF, the dry tablets based on CMS:Chitosan (1:1) unloaded (0%) and loaded with 50% PSDAO or with catalase, and the tablets based on 100% enzyme (PSDAO or catalase) presented some blue points at the external surface, corresponding to the pH indicator (Figure 1a,b). The surface of the entire tablets based on CMS:Chitosan excipients (with 0% and 50% enzyme loading) was blue during the 60 min of acidic incubation (SGF), showing a protection afforded by the formulation. At the surface of the whole tablets, some small orange regions were also detected, corresponding to a certain presence of acidity (mostly limited at the very outer layer). The formulation based on 100% PSDAO only was rapidly disintegrated and dissolved during the incubation in SGF medium. Differently, the tablets based on 100% catalase were compact after the SGF incubation, with no tendency of swelling or disintegration, but exhibiting an orange external surface of the tablets, showing lesser protection in acidic medium. When the tablets were cross-sectioned, the core of the tablets was dry, with no gastric fluid inside the tablets and, consequently, no solubilisation of the bromocresol green particles. Furthermore, a peripheral blue layer (pH greater than 5.4) close to the surface of the tablets was found (Figure 1a,b). These aspects are useful and important for further enzyme formulations, showing that not only the CMS:Chitosan excipients afforded a certain gastro-protection of bioactive agents, but protein itself can generate an outer protective gel layer keeping dry the core of the tablets.

Stability of enzyme formulations in simulated gastric fluid and enzyme delivery in simulated intestinal fluid

Formulations based on CMS, CMS:Chitosan (1:1) or Chitosan and containing 30% PSDAO presented a certain stability in SGF conditions (pH 1.2, pepsin) during all the period of incubation. After 60 min of gastric treatment, CMS:Chitosan (1:1) and Chitosan formulations assured a better protection of DAO than CMS (Figure 2a) and after 120 min of incubation, the CMS:Chitosan matrix presented a better efficacy in term of protection of PSDAO, with a 55.5% remaining DAO activity found inside the tablet (Figure 2a). In an acidic environment, Chitosan tablets form gels due to the presence of amino groups in its structure, contributing to the protection of active agent and, in the same time, assuring its slow-release. For better understanding of mechanisms controlling the DAO release, the tablets were also incubated in SIF only, without previous incubation in SGF. When incubated directly in SIF, the absence of the external gel of Chitosan generated a faster liberation of DAO for CMS:Chitosan and Chitosan formulations (Figure 2b) in comparison with the same formulations previously incubated in SGF (30, 60, 120 min), where the outer gel delayed the DAO delivery (Figure 2c-e). The formulation based on CMS:Chitosan (1:1) presented a better delivery of DAO than the Chitosan formulation (Figure 2b-e), probably due to the fact that the release time can also be modulated by *alpha*-amylase from pancreatin, acting on CMS excipient and accelerating thus the DAO delivery. The CMS tablets are not suitable for colon delivery because of their fast dissolution in SIF medium containing pancreatin.

The second therapeutic enzyme used in this study, catalase, was first formulated alone with CMS:Chitosan (1:1) at different loadings. It was observed that, at increasing catalase loading from 3.3% to 50%, its residual enzymatic activity found inside the tablet remained relatively constant (more than 80%) after 60 min of SGF incubation, suggesting that the catalase can undergo a kind of self-protection by possible protein-protein interactions in addition to the relative protection afforded by the excipients

(Figure 3a). As found by the pH indicator test, the assay of the enzyme activity showed that the formulation of 100% catalase tablets (excipient-free) presented a relatively good stability in gastric medium (60 min), with 63% catalase remaining enzymatic activity per tablet (Figure 3a). However, the presence of polymeric excipients is beneficial (more than 80% residual activity). Higher loading in catalase per tablet did not deliver higher percentages of catalase in SIF medium (Figure 3b). Only the CMS:Chitosan formulation containing 10% catalase liberated more than 50% catalase (enzymatic activity) after 480 min of SIF incubation. Differently, for the catalase loadings between 20% and 100%, less than 15% catalase enzymatic activity was released during the first 480 min in SIF (Figure 3b). Protein-protein assembling can explain lesser release at increasing loading of catalase.

In order to reduce the amount of the H_2O_2 hazardous by-product of DAO, the catalase, as second therapeutic enzyme, was added to the PSDAO formulation based on CMS:Chitosan. The presence of catalase in the PSDAO formulation diminished the determined DAO remaining enzymatic activity inside the tablet after 60 min of SGF incubation, either for 10% or 20% catalase (Figure 4a). A reduction of remaining catalase activity, after 60 min in SGF, was also observed for the formulations containing the PSDAO (Figure 4b). For the bi-enzymatic formulations with CMS:Chitosan, the presence of 10% or 20% catalase did not significantly modify the DAO liberation (Figure 4c). Differently, for the same formulations, the presence of 20% PSDAO preparation increased the catalase liberated in SIF medium (Figure 4d). This increase was more accentuated for the formulation containing 20% PSDAO:10% Catalase than in the case of the formulation containing 20% PSDAO:20% Catalase.

Using the peroxidase coupled assay, an apparent decrease of DAO enzymatic activity was obtained in the presence of catalase in function of PSDAO:Catalase ratios (Figure 5a), due to the diminution of released H_2O_2 (substrate for catalase). Differently, using the GDH coupled assay, the DAO enzymatic activity was found constant (Figure

5b) for the same PSDAO:Catalase ratios, because the assay measures specifically NH_3 and not H_2O_2 , showing that the DAO enzymatic activity is not affected by the presence of catalase.

The DAO liberation in SIF from the PSDAO:Catalase bi-enzymatic CMS:Chitosan tablets, evaluated with the peroxidase coupled assay, showed an apparent reduction of released DAO measured activity more accentuated for the formulation containing a higher loading of catalase (20% PSDAO:20% Catalase) compared to the mono-enzymatic formulation containing 20% PSDAO only (Figure 6a). When DAO liberation in SIF was determined by the GDH coupled assay (specific for the NH_3 released), no significant differences were obtained between the mono-enzymatic PSDAO formulation and the bi-enzymatic formulations containing 10% or 20% catalase (Figure 6b).

Discussion

The hydrophilic matrix based on binary mixtures of CMS:Chitosan (1:1), in which both macromolecular excipients contribute to a physical and chemical stabilization of the matrix [33-34], seems a good polymeric system for the formulation of orally administrable therapeutic proteins, such as PSDAO and catalase. As shown in the loaded pH indicator assay, in acidic medium, the CMS:Chitosan matrix forms a gel barrier at the surface, affording thus a certain protection against gastric acidity, despite the fact that the tablets are not coated with gastro-protective materials. The presence of the proteins in the formulations may also contribute to gastro-protection, as found for catalase at loading of 50% and 100%. The CMS:Chitosan formulations containing PSDAO only were less stable at 50% loading and unstable when formulated without CMS:Chitosan (100% PSDAO). This lower stability of PSDAO tablet could be related to a certain amount of phosphate in the powder extract remaining after the preparation procedures. On the other hand, the presence of hydrophilic phosphate in PSDAO

preparation can be an advantage for formulation, ensuring the tablet hydration and release of loaded enzyme.

The PSDAO is very sensitive to gastric acidity and to pepsinolysis, losing its entire enzymatic activity in less than 15 min of incubation, either in the presence or absence of pepsin. Differently, the DAO maintains a certain stability at proteolysis to pancreatin [36], and this is an important aspect for possible therapeutic applications of the enzyme when released in intestinal fluids. The CMS:Chitosan matrix could present a potential interest, ensuring a good protection of the DAO (55.5% activity) even after 120 min incubation in SGF and liberating variable amounts of therapeutic enzyme in the SIF containing pancreatin, with maximal release at about 8 h (a time convenient for tablets to reach the colon). The release of bioactive agent can be controlled by an adequate choice of the amount and of the molecular weight of Chitosan in the tablet [34]. Thus, for the Chitosan of 600 kDa (the present study), a delay in the DAO liberation was already observed after 30 min of gastric incubation tablets of CMS:Chitosan (1:1) compared to those based on CMS matrix only, which released rapidly the bioactive agent in SIF.

A possible role of antioxidants in therapy of IBD has already been suggested. For instance, an antioxidant effect of catalase on colonic biopsy specimens from a rat model of colitis was reported [39]. Therefore, the oral administration of catalase could present a therapeutical interest. Catalase, when compressed as excipient-free tablet (100% catalase loading), presented a certain gastric stability (63% remaining activity inside the tablet) due to possible intra- and inter-chain protein associations, generating an outer protective gel layer and preventing thus the gastric fluid access to the tablet. Differently, the free catalase solution (unformulated) was almost totally degraded in the same conditions (data not shown). A certain ratio between catalase and polymeric excipients (CMS and Chitosan) should be kept to better protect and to delay the catalase delivery over 480 min in SIF, either in the case of mono-enzymatic or bi-

enzymatic PSDAO:Catalase formulations. The presence of PSDAO in the bi-enzymatic formulations contributed to a better liberation of catalase, probably, due to the presence of phosphates in the PSDAO vegetal extract which enhance the dissolution. The CMS:Chitosan formulation containing 20% PSDAO:10% Catalase liberated more catalase than the bi-enzymatic formulation containing 20% PSDAO:20% Catalase, where the protein-protein interactions were probably more representative. Although the starch used in the formulation is modified (CMS), it still remains a potential substrate for alpha-amylase present in pancreatin [31], and can contribute to the release of therapeutic enzyme. This is an important advantage of CMS as excipient.

Vegetal DAO enzyme presents a high specificity for primary diamines and histamine, catalyzing their oxidation to corresponding aldehyde, H_2O_2 and NH_3 . In the presence of putrescine as substrate for DAO, the OPDA, as co-substrate of peroxidase [36], is oxidised into a coloured product (azo-aniline) by the released H_2O_2 , under peroxidase catalysis (Scheme 1a). When catalase is present, it will decompose H_2O_2 released from DAO enzymatic activity, resulting in a decrease of the azo-aniline product of the peroxidase reaction. This alters the DAO dosage and apparently decreases the measured DAO activity (Scheme 1a). When determined by the GDH coupled assay (specific for NH_3 and not for H_2O_2), the DAO enzymatic activity remained constant for all the tested ratios of PSDAO:Catalase (Scheme 1b). The DAO enzymatic activity consists in oxidation of putrescine in the presence of dissolved O_2 (the two substrates of DAO). When catalase is also added in solution (different ratios of PSDAO:Catalase), part of H_2O_2 produced by DAO will be decomposed by catalase generating, thus, some supplementary O_2 , which is expected to enhance the rate of substrate (histamine, putrescine) oxidation and even to shift the equilibrium in favour of the reaction products. From the apparent decrease of DAO enzymatic activity in the presence of catalase, it is possible to determine the number of μ moles of H_2O_2 decomposed by catalase. Consequently, from differences between DAO enzymatic activity of PSDAO only and at different ratios PSDAO:Catalase, it is possible to

estimate the additional O_2 produced by catalase in our *in vitro* study (0.0115, 0.0185 and 0.026 $\mu\text{moles } O_2/10 \text{ min/mL}$ reactional medium, at 37 °C). The concentration of O_2 currently dissolved in water at 37 °C is of about 0.212 $\mu\text{moles } O_2/\text{mL}$, which is in excess compared with the O_2 generated from the catalase activity. Thus, the amount of additional O_2 produced by H_2O_2 decomposition seems not high enough to enhance the DAO enzymatic activity, which remained constant in the presence of catalase. However, the association of catalase to DAO is supposed to be therapeutically beneficial in IBD treatment, since the volume of available fluid in the colon is reduced and the O_2 availability is scarce. Thus, additional low amounts of O_2 will probably be efficient for DAO activity.

To test the capacity of our bi-enzymatic CMS:Chitosan formulations (with 20% PSDAO:10% Catalase or 20% PSDAO:20% Catalase loading) to produce and to decompose H_2O_2 , two enzymatic assays for DAO enzymatic activity (detecting H_2O_2 and NH_3) were used (Scheme 1). The apparent decrease of DAO enzymatic activity, determined via peroxidase assay, observed for the bi-enzymatic CMS:Chitosan formulations, was due to the decomposition of H_2O_2 by catalase, which was liberated from the tablets almost in the same time with DAO. Using the GDH coupled assay, there were no differences between the activity of the released DAO formulated alone (20% loading) or as bi-enzymatic formulations, confirming the results obtained before with different ratios of the two non-formulated free enzymes. This fact is important, because, when the bi-enzymatic formulation is administrated *in vivo*, the released DAO will degrade the histamine (endogenous, from intestinal inflammatory reactions, or exogenous, from food) and will produce H_2O_2 , a pro-oxidant with damaging effects. Therefore, the catalase will be beneficial, particularly when liberated almost in the same time as DAO, to decompose the H_2O_2 from histamine catabolism or from other inflammatory reactions. It was hypothesized that the efficiency of current treatments in IBD can also be related to their antioxidant actions. Thus, 5-aminosalicylate reduced mucosal oxidative species production by inflamed human colorectal biopsy [40] and

lipid peroxidation [41]. A combination of superoxide dismutase and desferroxamine (Desferal®) was reported to be effective in the treatment of Crohn's disease [42]. Since the colonic mucosa may be subjected to significant oxidative stress during inflammation related or not to histamine, there is an interest for new antioxidant treatments for IBD. Besides reducing local tissue inflammation through decomposition of pro-inflammatory histamine, DAO also seems to present some antioxidant properties, as previously shown with other copper oxidases [4-6], contributing thus to prevent free radical-mediated tissue injury. In this context, the DAO appears as a bi-functionnal enzyme: (i) histaminase, with an amine oxidase activity controlling the level of biogenic amines, decomposing the pro-inflammatory histamine, and (ii) antioxidant, scavenging the pro-oxidant oxidative species. The presence of catalase in our mono- and bi-enzymatic CMS:Chitosan formulations has also several roles: (i) to assure the stability of the formulations in simulated gastro-intestinal conditions and (ii) to afford a certain gastro-protection, as catalase can undergo a kind of self-protection by protein-protein interactions, (iii) to reduce the amount of the hazardous H_2O_2 , a pro-oxidant produced from DAO activity or from other inflammatory reactions. In this context, the bi-enzymatic PSDAO:Catalase formulation with CMS:Chitosan excipients could be an alternative for a better control of the inflammation and related deleterious effects occurred in the inflammatory bowel diseases.

Conclusion

The association of DAO to catalase, both formulated as monolithic tablets with CMS and Chitosan co-excipients, is expected to improve the treatment of inflammatory enteric diseases by reducing local inflammation through acceleration of histamine catabolism and by counteracting free radical-mediated tissue injury. A possible therapeutic effect of DAO could also be expected in pseudo-allergic diseases, due to the elimination of histamine excess in intestine, and in intestinal tumors, due to the anti-neoplastic properties of amine oxidases. Our proposed formulations may open the

way to innovative and non-toxic bi-functional enzyme therapeutic approaches for intestinal diseases.

Acknowledgements

The NSERC Discovery granted to M.A. Mateescu and the Canada graduate studentship from NSERC afforded to Carmen Calinescu are gratefully acknowledged.

References

- [1] Mondovi B *et al.* Purification of pig-kidney diamine oxidase and its identity with histaminase. *Biochem J* 1964; 91: 408-415.
- [2] Mondovi B *et al.* The biological functions of amine oxidases and their reaction products: an overview. In: Zappia V, Pegg AE, eds. *Progress in polyamine research*. New York: Plenum Press, 1989: 147-161.
- [3] Atanasiu R *et al.* Antiarrhythmic effects of ceruloplasmin during reperfusion in the ischemic isolated rat heart. *Can J Physiol Pharmacol* 1995; 73: 1253-1261.
- [4] Mateescu MA *et al.* A new physiological role of copper amine oxidases: cardioprotection against reactive oxygen intermediates. *J Physiol Pharmacol* 1997; 48 (Suppl. 2): 110-121.
- [5] Mateescu MA, Nadeau R. Copper amine oxidases as antioxidant and cardioprotective agents. In: Floris G, Mondovi B, eds. *Copper amine oxidases: structures, catalytic mechanisms, and role in pathophysiology*. CRC Press, 2009: 253-260.
- [6] Mondovi B *et al.* New aspects on the physiological role of copper amineoxidases. *Curr Top Med Chem* 1997; 2: 31-43.
- [7] Masini E *et al.* A plant histaminase modulates cardiac anaphylactic response in guinea pig. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 840-846.
- [8] Masini E *et al.* Protective effects of a plant histaminase in myocardial ischemia and reperfusion injury *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309: 432-439.
- [9] Masini E *et al.* Effect of a plant histaminase on asthmalike reaction induced by inhaled antigen in sensitized guinea pig. *Eur J Pharmacol* 2004; 502: 253-264.
- [10] Masini E *et al.* Beneficial effects of a plant histaminase in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *Shock* 2007; 27: 409-415.
- [11] Beaven MA. Factors regulating availability of histamine at tissue receptors. In: Ganellin CN, Parson ME, eds. *Pharmacology of histamine receptors*. Bristol, 1982: 101-105.
- [12] Taylor SL. Histamine and food poisoning: toxicology and clinical aspects. *CRC Crit Rev Toxicol* 1986; 17: 91-128.

- [13] Sattler J *et al.* Food-induced histaminosis as an epidemiological problem: plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase (DAO). *Agents Actions* 1988; 23: 361-365.
- [14] Chin KW *et al.* The histamine content of oriental foods. *Food Chem Toxicol* 1989; 27: 283-287.
- [15] Bodmer S *et al.* Biogenic amines in foods: histamine and food processing. *Inflamm Res* 1999; 48: 296-300.
- [16] Owen DAA. Inflammation – histamine and 5-hydroxytryptamine. *Brit Med Bull* 1987; 43: 256-269.
- [17] Fox CC *et al.* Enhancement of human intestinal mast cell mediator release in active ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1990; 99: 119-124.
- [18] Schmidt WU *et al.* Human intestinal diamine oxidase (DAO) activity in Crohn's disease: a new marker for disease assessment?. *Agents Actions* 1990; 30: 267-270.
- [19] Knutson L *et al.* The jejunal secretion of histamine is increased in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 1990; 98: 849-854.
- [20] Cricco G *et al.* Histamine as an autocrine growth factor in experimental carcinomas. *Agents Actions* 1994; 43: 17-20.
- [21] Kusche J *et al.* Large bowel tumor promotion by diamine oxidase inhibition: animal model and clinical aspects. In: Zappia V, Pegg E, eds. *Advances in experimental medicine and biology. Progress in polyamines research. Novel biochemical, pharmacological and clinical aspects*. New York: Plenum Press, 1988: 745-752.
- [22] Mondovi B *et al.* Studies on the effect of polyamines and their products on Ehrlich ascites tumours. *Agents and Actions* 1982; 12: 450-451.
- [23] Toninello A *et al.* Amine oxidases in apoptosis and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1765: 1-13.
- [24] Kusche J *et al.* Intestinal diamine oxidase and histamine release in rabbit mesenteric ischemia. *Gastroenterology* 1981; 80: 980-987.
- [25] Grisham MB, Granger DN. Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. *Dig Dis Sci* 1988; 33: 6S-15S.

- [26] Buffinton GD, Doe WF. Depleted mucosal antioxidant defences in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 911-918.
- [27] Fogel WA, Lewinski A. The effects of diamine oxidase administration on experimental ulcerative colitis in rats. *Inflamm res* 2006; 55: S63-S64.
- [28] Phillips CP, Snow RA. Lyophilized polyethylene oxide modified catalase composition, polypeptide complexes with cyclodextrin and treatment of diseases with the catalase compositions. US Patent: 5334382, 1994.
- [29] Pietrangeli *et al.* Inactivation of copper-containing amine oxidases by turnover products. *Eur J Biochem* 2004; 271: 146-152.
- [30] Zhang H, Neau SH. *In vitro* degradation of chitosan by bacterial enzymes from rat cecal and colonic contents. *Biomaterials* 2002; 23: 2761-2766.
- [31] Calinescu C *et al.* Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipient for *Escherichia coli* oral formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 2005; 60: 53-60.
- [32] Calinescu C *et al.* Carboxymethyl high amylose starch for F4 *fimbriae* gastro-resistant oral formulation. *Int J Pharm* 2007; 343: 18-25.
- [33] Leonida M, Mateescu MA. Drug release profiles from Chitosan – carboxymethyl-starch matrices stabilized by ionic interactions. Transactions of the 33rd Annual Meeting of the Controlled Release Society, #827, 2006.
- [34] Calinescu C, Mateescu MA. Carboxymethyl high amylose starch: Chitosan self-stabilized matrix for probiotic colon delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 70: 582-589.
- [35] U.S. Pharmacopeia National Formulary U.S.P. XXIV, NF XIX, United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD, 2000.
- [36] Calinescu C *et al.* Zymographic assay of plant diamine oxidase on entrapped peroxidase polyacrylamide gel electrophoresis. A study of stability to proteolysis. *Anal Bioanal Chem* 2010; 396:1281-1290.
- [37] Claiborne A. Catalase activity. In: Greenwald RA, ed. *CRC Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, 1985: 283-284.
- [38] Lowry OH *et al.* Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.

- [39] Millar AD *et al.* Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis. *Gut* 1996; 39: 407-415.
- [40] Simmonds NJ *et al.* Chemiluminescence assay of mucosal reactive metabolites in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1992; 103: 186-196.
- [41] Ahnfelt-Ronne I *et al.* Clinical evidence supporting the radical scavenger mechanism of 5-aminosalicylic acid. *Gastroenterology* 1990; 98: 1162-1169.
- [42] Emerit J *et al.* Phase II trial of superoxide dismutase (CuZn SOD) in the treatment of Crohn's disease. *Free Radic Res Commun* 1991; 12: 563-569.

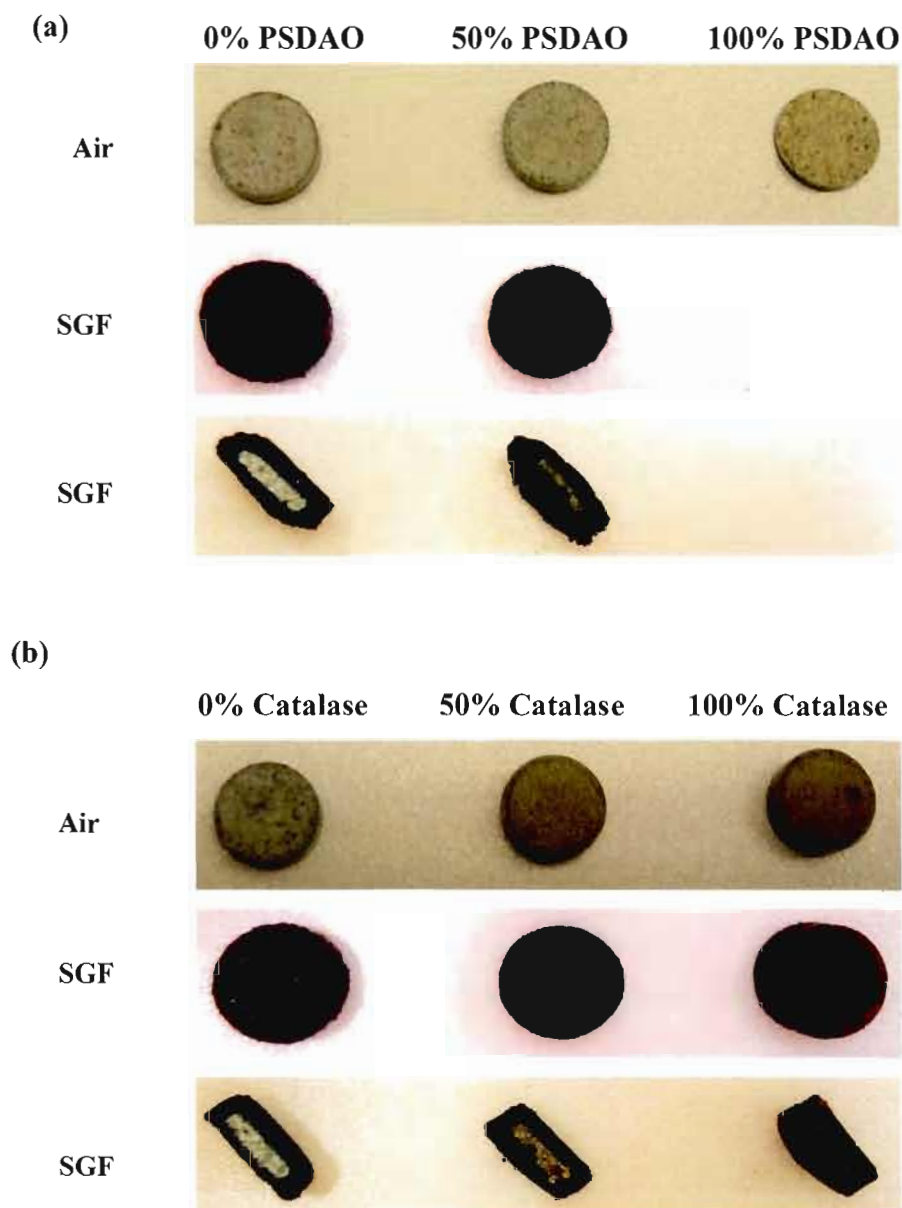
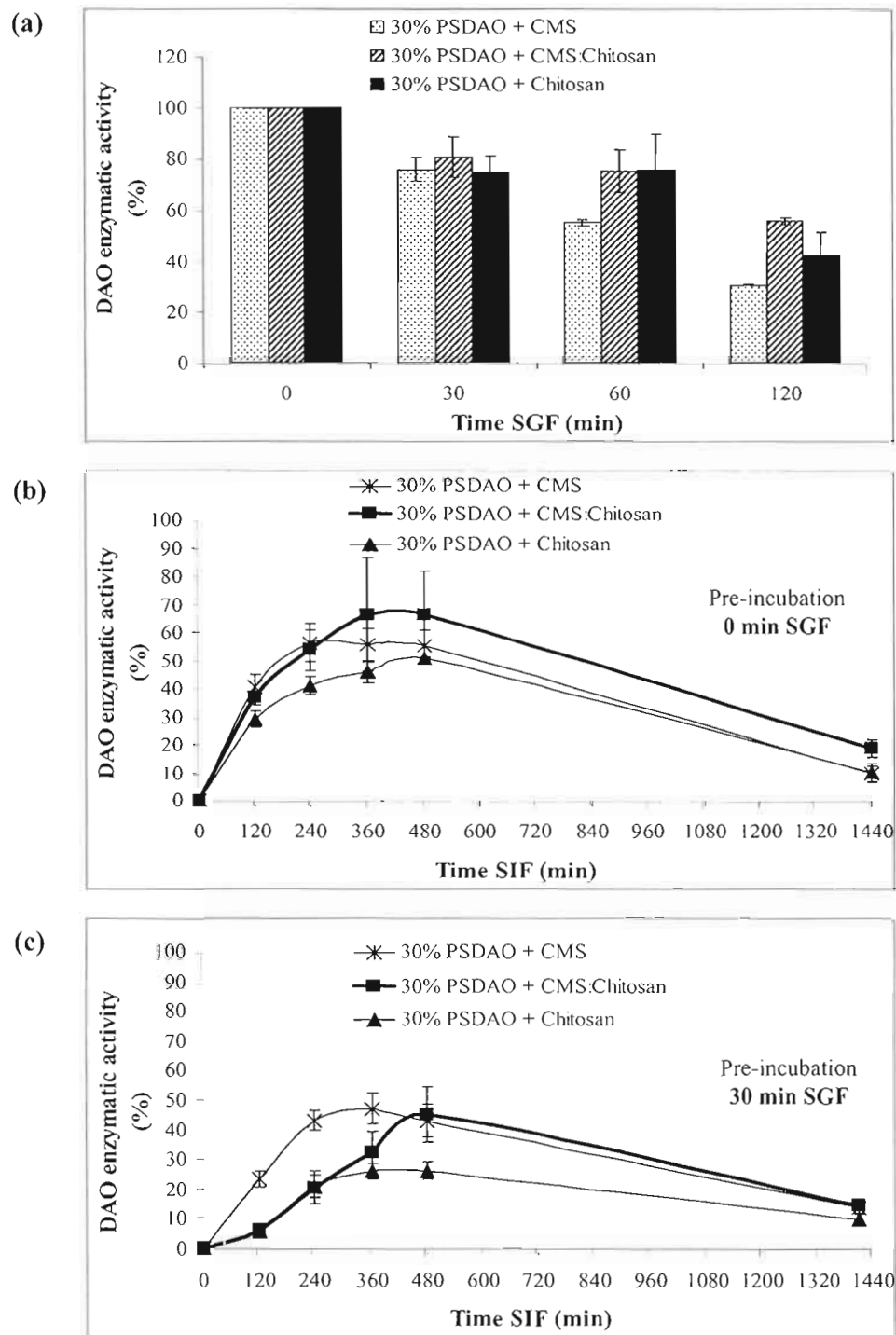


Figure 1. pH stability of enzyme formulations based on CMS:Chitosan.

Monolithic tablets based on (a) CMS:Chitosan (1:1) with 0% and 50% enzyme loading and on excipient-free 100% PSDAO (diamine oxidase vegetal extract) or (b) catalase, containing bromocresol green (pH indicator). Untreated (air) or incubated tablets for 60 min in simulated gastric fluid containing pepsin, at 50 rpm and 37 °C (whole and cross-sections of tablets). The blue color indicates protection against gastric acidity.



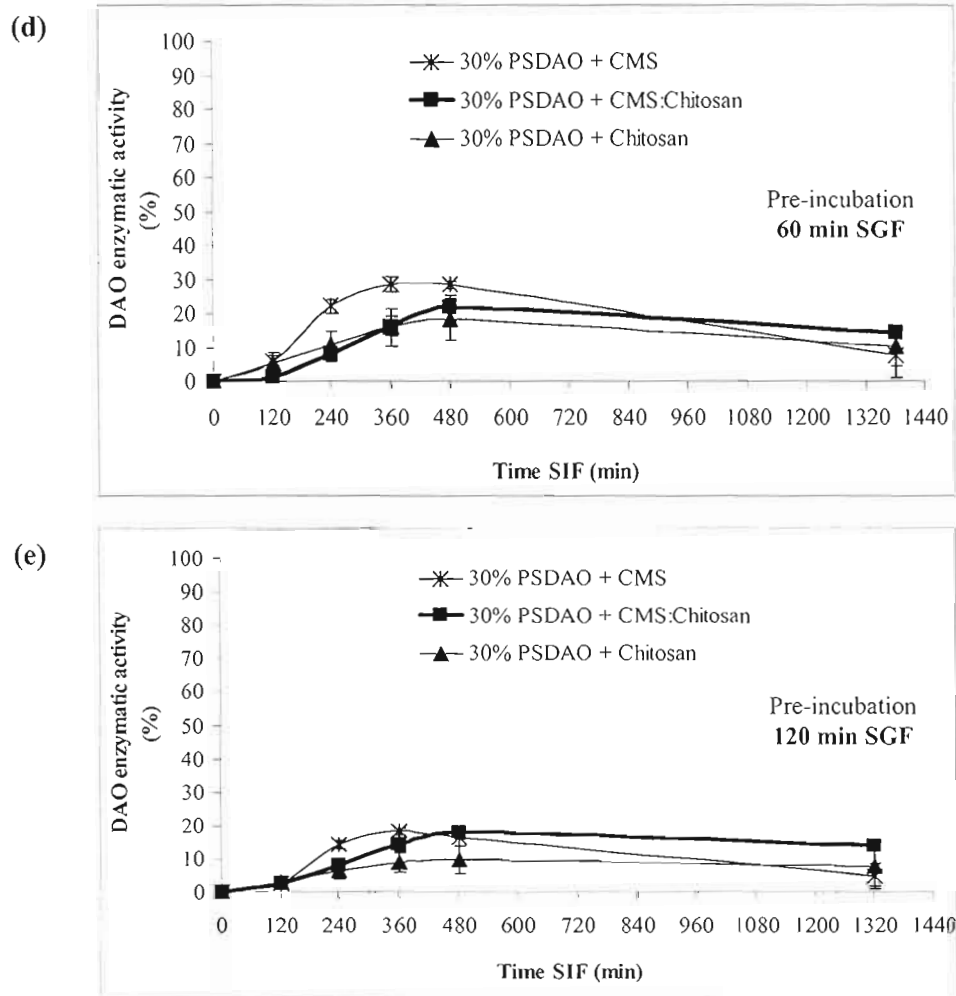


Figure 2. Gastric stability and intestinal delivery of vegetal DAO (PSDAO) in different formulations.

Monolithic tablets based on CMS, CMS:Chitosan (1:1) or Chitosan and containing 30% PSDAO were incubated up to 120 min in simulated gastric fluid (SGF with pepsin). (a) DAO remaining enzymatic activity (%) inside the tablets, as determined after different periods of SGF treatment. The liberation of DAO (%) from monolithic tablets in simulated intestinal fluid (SIF with pancreatin) after (b) 0 min, (c) 30 min, (d) 60 min and (e) 120 min in SGF incubation (50 rpm and 37 °C). The DAO activity is expressed in percentages, considering as 100% the values determined in 50 mL phosphate buffer at 0 min. For DAO formulated with CMS, the 100% was 0.45 ± 0.032 EU/mL sample, 0.41 ± 0.019 EU/mL sample for CMS:Chitosan or 0.40 ± 0.03 EU/mL sample for Chitosan. $n=3$

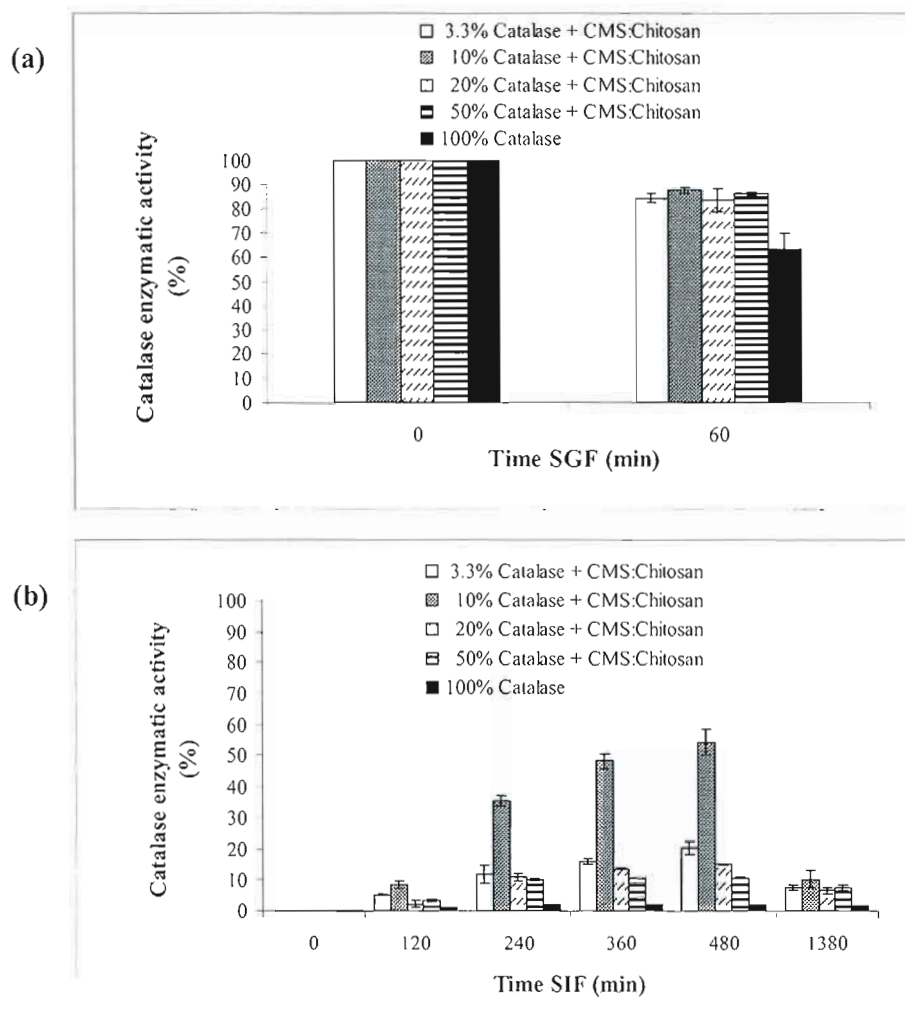


Figure 3. Gastric stability and intestinal release of catalase at different loadings formulated with CMS:Chitosan.

Monolithic tablets of CMS:Chitosan (1:1) with increasing loading of catalase and of excipient-free (100%) catalase were first incubated for 60 min in simulated gastric fluid (SGF with pepsin) at 50 rpm and 37 °C. The enzymatic activity of catalase (%) was evaluated (a) after 60 min of gastric incubation of tablets and (b) during the liberation in simulated intestinal fluid (SIF with pancreatin), after previous incubation of 60 min in SGF. Catalase activity was expressed in percentage, considering for each loading, as 100%, the catalase activity formulated with CMS:Chitosan determined in 50 mL phosphate buffer at 0 min. $n=3$

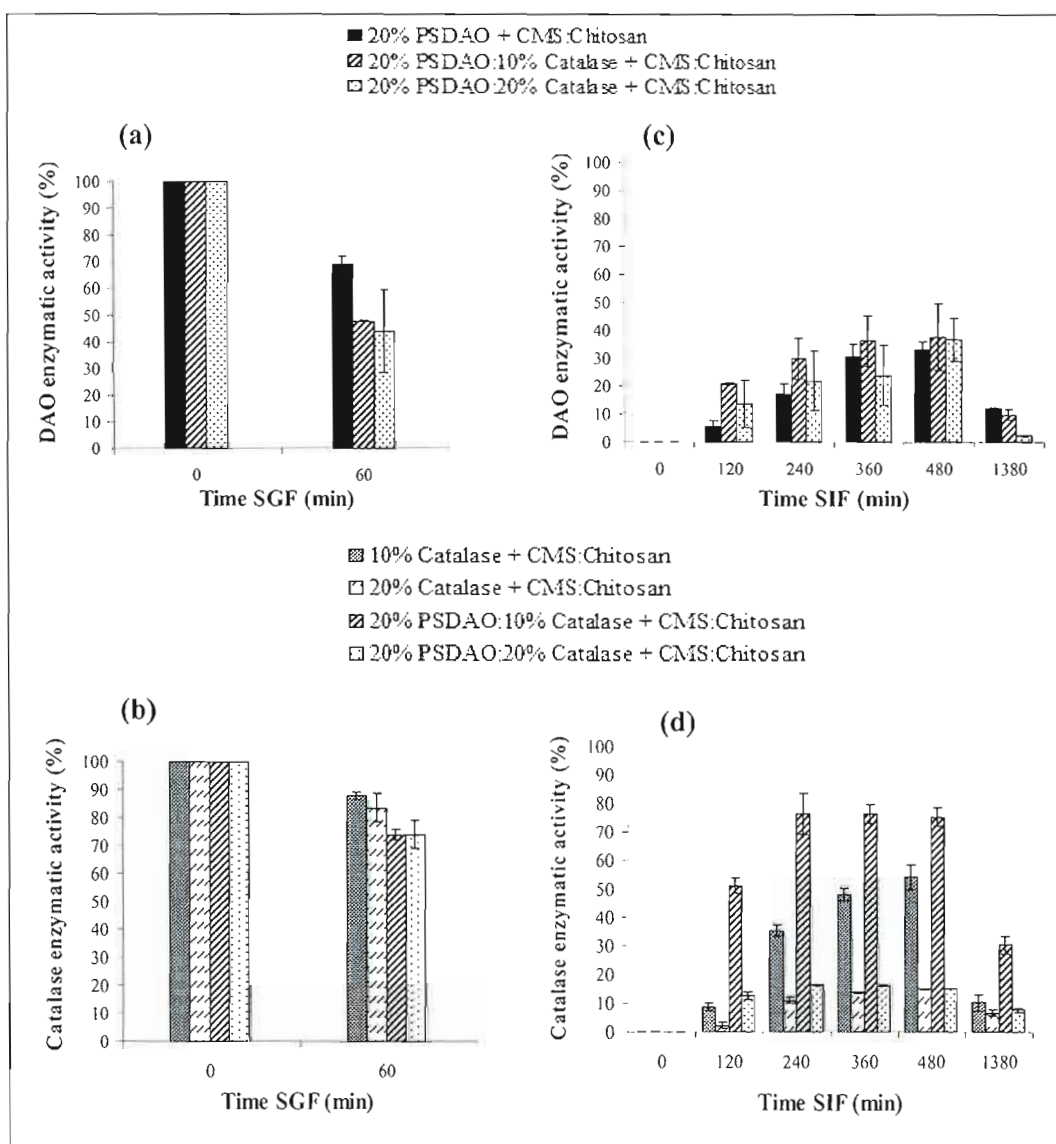


Figure 4. Mono- and bi-enzymatic CMS:Chitosan formulations containing vegetal PSDAO and/or catalase.

Gastric stability in simulated gastric fluid (SGF) containing pepsin (0 and 60 min) of (a) PSDAO and (b) catalase as mono- and bi-enzymatic formulations based on CMS:Chitosan (1:1) and (c, d) their liberation in simulated intestinal fluid (SIF) containing pancreatin, after 60 min tablet incubation in SGF. The enzymatic activity of DAO (20% loading: 0.39 ± 0.001 EU/mL sample) and of catalase (10% and 20% loading), formulated as mono- and bi-enzymatic CMS:Chitosan tablets, and determined in 50 mL phosphate buffer (0 min), was considered as 100%. $n=3$

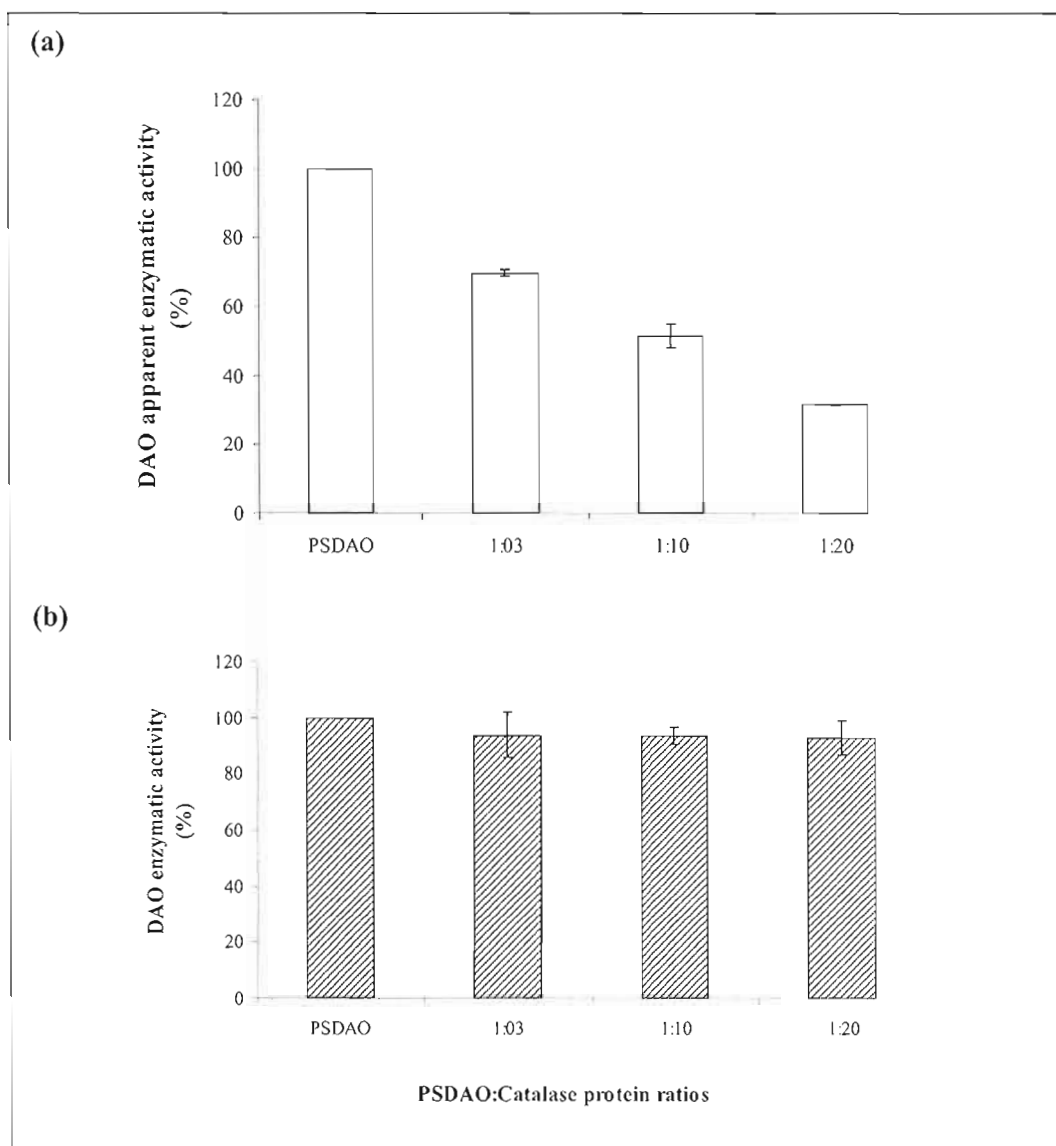


Figure 5. Evaluation of DAO enzymatic activity in the presence of catalase.

DAO enzymatic activity was evaluated (a) by the peroxidase coupled assay of the released H_2O_2 and (b) by glutamate dehydrogenase (GDH) coupled assay of the released NH_3 . The DAO enzymatic activity (%) was evaluated at different mass ratios (6:1, 2:1, 1:1) of PSDAO:Catalase powders, dissolved in 50 mL phosphate buffer solution (pH 7.0), containing different PSDAO:Catalase protein ratios (1:3, 1:10, 1:20). The enzymatic activities of PSDAO, determined in phosphate buffer by peroxidase coupled assay (12.81 ± 0.27 EU/mg protein) and by GDH coupled assay (13.15 EU/mg protein), in absence of catalase, were considered as 100%. $n=3$

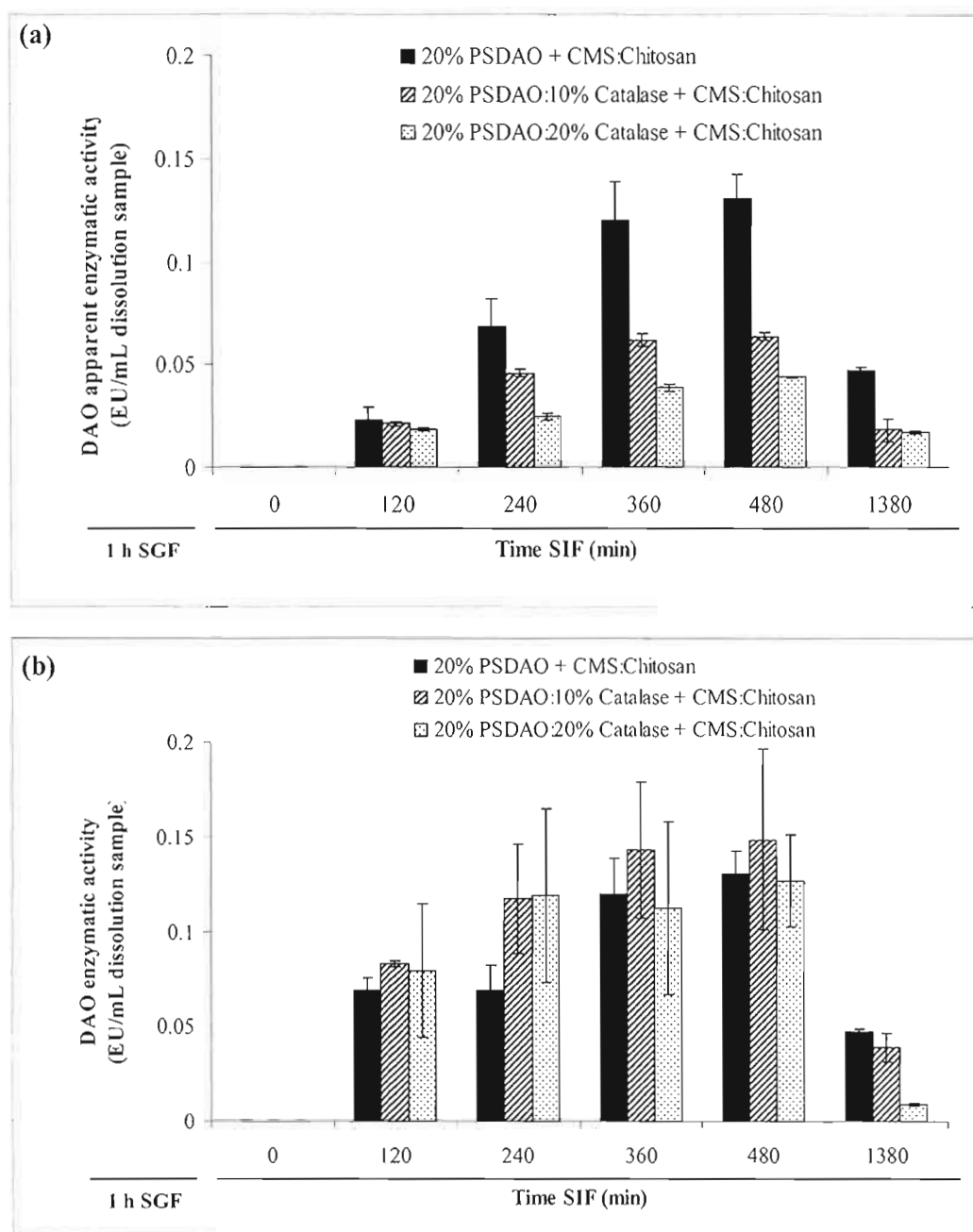


Figure 6. *In vitro* evaluation of the bi-enzymatic formulation based on CMS:Chitosan.

Enzymatic activity of DAO released in simulated intestinal fluid (SIF with pancreatin), determined (a) by the peroxidase coupled assay, specific for the released H_2O_2 , and (b) by the glutamate dehydrogenase coupled assay, specific for the released NH_3 . Monolithic CMS:Chitosan (1:1) tablets were first incubated for 60 min in simulated gastric fluid (with pepsin), followed by incubation in SIF, at 50 rpm and 37 °C. $n=3$

CHAPITRE IX

DISCUSSIONS ET CONCLUSION

Il est connu que pour la majorité des agents bioactifs administrés par la voie orale, l'acidité et la présence des enzymes digestives (*i.e.* pepsine, enzymes pancréatiques) représentent un milieu agressif. Ainsi, les agents actifs de nature protéique (enzymes/protéines thérapeutiques) et les probiotiques peuvent perdre facilement leurs propriétés spécifiques, en étant dégradés ou inactivés avant qu'ils puissent atteindre leur sites cibles intestinaux. En conséquence, ces agents doivent être formulés sous forme d'un système de livraison qui les protège au niveau de l'estomac et qui les libère au niveau de l'intestin. De plus, pour plusieurs agents bioactifs, il est important que leur libération puisse avoir lieu à leur site d'action. Comme il a été déjà mentionné dans le chapitre II (section 2.2), la libération contrôlée sur des longues périodes de 18-24 h n'est pas toujours souhaitable, car une grande partie de l'agent actif peut être perdue, en étant libéré avant ou après son site spécifique. Dernièrement, le développement des systèmes de livraison ciblée des agents bioactifs à base des polymères biocompatibles et biodégradables a reçu une attention considérable. Dans ce contexte, l'amidon riche en amylose, non-réticulé et modifié avec des groupes carboxyméthyle (carboxyméthyl amidon, CMA), a été proposé comme nouvel excipient pour la formulation pharmaceutique des agents bioactifs avec administration orale (Mulhbach, Mateescu et Calinescu, 2004).

Les groupes hydroxyle jouent un rôle important dans l'organisation de la structure des matrices à base d'amidon en participant au contrôle de la libération d'un agent actif (Dumoulin *et al.*, 1998; Ispas-Szabo *et al.*, 2000). Plusieurs modifications chimiques peuvent être réalisées par la substitution partielle de ces groupes hydroxyle de l'amidon avec différents agents de substitution. Ainsi, le CMA a été synthétisé en traitant l'amidon avec l'acide monochloracétique, introduisant ainsi des groupes carboxyméthyle (CM-) avec la fonction carboxylique ionisable. La présence des groupes CM- a comme effet de changer les propriétés du polymère en fonction du pH (Mulhbachter, Ispas-Szabo et Mateescu, 2004). À pH supérieur à 7, le dérivé d'amidon (CMA) subit hydratation, avec une augmentation du volume de gonflement, suivi par une augmentation de sa dissolution. Ainsi, le CMA non-réticulé peut être considéré comme un excipient polymérique «intelligent», en modifiant ses propriétés en fonction du pH. Le CMA (non-réticulé) a été associé avec les bactéries *Escherichia coli*, *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*), avec les *fimbriae* F4 ou avec la diamine oxydase (DAO), sous forme de comprimés monolithiques (Calinescu *et al.*, 2005; 2007; Calinescu et Mateescu, 2008; Calinescu *et al.*, article soumis).

La première section expérimentale de la thèse (Chapitre V; Calinescu *et al.*, 2007) a été consacrée à la formulation des *fimbriae* F4, un vaccin sous-unitaire contre la diarrhée post-sevrage chez le porc, avec le CMA, un dérivé carboxyméthylé non-réticulé (Figure 5.1). Il est connu que, chez le porcelet post-sevré, *Escherichia coli* (F4+) est l'agent pathogène le plus fréquemment rencontré qui cause la diarrhée aqueuse. Comme les muqueuses représentent une porte d'entrée possible des agents pathogènes dans un organisme vivant, l'induction d'une réponse immunitaire mucoale forte présente une grande importance dans la lutte contre les pathogènes gastro-entériques. Dans ce contexte, la recherche et le développement des vaccins oraux à base des *fimbriae* F4, qui peuvent contribuer à créer une immunité au niveau de la muqueuse intestinale, s'avèrent d'une grande importance.

L'originalité de notre approche utilisant le CMA non-réticulé a permis la formulation des *fimbriae* F4 sous forme de comprimés administrables par voie orale tout en gardant l'intégrité structurale et fonctionnelle de leur sous-unité majeure (FaeG) suite au passage dans le milieu gastrique simulé. Les comprimés monolithiques à base de CMA restent en général compacts dans un milieu acide et libèrent assez rapidement les *fimbriae* dans le milieu intestinal. Ainsi, dans un milieu gastrique simulé, l'excipient à base de CMA sodique, CMA (Na^+), sous forme de comprimé, change le cation (Na^+) pour un proton (H^+), ce qui génère une structure compacte. Celle-ci assure des propriétés locales de tampon, en protégeant l'agent bioactif contre la dénaturation acide et enzymatique (pepsine). Suite au passage vers un milieu neutre ou faible alcalin qui simule le milieu intestinal, la forme protonée de CMA, CMA (H^+), change les protons avec les cations, facilitant les processus d'hydratation et gonflement, et générant la dissolution de la matrice. Les *fimbriae* sont libérées au fur et à mesure avec le gonflement et la dissolution de la matrice polymérique.

L'utilisation du CMA a permis de diminuer la quantité des *fimbriae* administrée et le nombre de doses nécessaires à la vaccination des animaux durant les études *in vivo* réalisées en collaboration avec l'équipe du Dr. Fairbrother (Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal). Cette formulation semble intéressante, surtout qu'à date il n'y avait pas d'autres formulations fonctionnelles rapportées pour les *fimbriae* F4 à cause des possibles interactions entre ces dernières et les excipients utilisés. En général, les formulations à base des *fimbriae* F4 doivent être enrobées pour assurer la gastro-résistance de ces agents bioactifs (Snoeck *et al.*, 2003), et leur libération n'est pas toujours optimale à cause des interactions qui apparaissent entre les *fimbriae* et le matériel d'enrobage (*i.e.* Eudragit 30D) (Huyghebaert *et al.*, 2005).

Comme la sous-unité majeure FaeG des *fimbriae* F4 a un rôle important dans le processus d'adhérence des *fimbriae* au niveau des récepteurs, la préservation de sa conformation représente une condition essentielle pour l'induction d'une réponse

immunitaire mucosale chez le porcelet. Dans ce contexte, la formulation de CMA a assuré une bonne protection de la sous-unité majeure des *fimbriae* contre le milieu acide (gastrique) pour une période de deux heures, contrairement aux sous-unités majeures de *fimbriae* F4 libres, non-formulées, qui ont été dégradées partiellement (Figure 5.2). Nos résultats obtenus sur la stabilité des *fimbriae* non-formulées dans le milieu gastrique simulé concordent avec ceux de Snoeck et ses collaborateurs (2004). Ainsi, dans cette étude, il a été montré que les *fimbriae* F4 sont dégradées partiellement après 15-30 minutes d'incubation dans un milieu gastrique simulé, tandis que pour les périodes de temps plus longues (plus de 3 h), les *fimbriae* sont dégradées complètement. Les *fimbriae* F4 présentent une certaine résistance à la digestion gastrique qui est essentielle pour leur antigenicité.

L'ajout des groupes CM- sur l'amidon a comme résultat l'obtention des dérivés d'amidon substitués, et leurs propriétés sont principalement déterminées par le degré total de substitution. Une substitution préférentielle de l'amidon se fait à la position O-2 de l'unité répétitive de glucose (Tableau 5.1). La modification chimique de l'amidon a des propriétés bénéfiques sur la stabilité des comprimés dans le milieu acide/gastrique. Ainsi, notre équipe a montré que les comprimés à base de CMA restent stables dans un milieu acide, tandis que les comprimés à base d'amidon (non-modifié chimiquement) se désintègrent rapidement (Calinescu *et al.*, 2005). Cette stabilité peut être expliquée par la présence des groupements CM (carboxyméthyle). Ainsi, les groupes carboxyle protonnés provenant des chaînes polymériques situées en proximité peuvent former des dimères carboxyle - carboxyle par des ponts d'hydrogène, en stabilisant la structure de la matrice de CMA. En même temps, les groupes hydroxyle de l'amidon peuvent aussi être impliqués dans la formation des nouveaux ponts d'hydrogène avec les groupes hydroxyle et carboxyle, contribuant à une stabilisation supplémentaire de la matrice. De plus, nous avons aussi montré que les formulations de CMA (comprimés) contrôlent leur pH interne grâce au pouvoir

tampon des groupes carboxyliques, conservant ainsi l'activité de l'agent bioactif (Calinescu *et al.*, 2005).

Il était intéressant d'établir si les *fimbriae* peuvent être libérées du comprimé dans le milieu intestinal simulé. Au début, nous avons montré qu'il y a eu une libération des *fimbriae* F4 dans le milieu intestinal simulé qui ne contenait pas de pancréatine (Figure 5.3) et cette libération commençait après deux heures. Différemment du carboxyméthyl cellulose ou d'autres excipients polymériques, la matrice de CMA, malgré sa modification chimique, est encore reconnue par l'alpha-amylase présente dans la pancréatine (Calinescu *et al.*, 2005). Un certain équilibre entre le degré de substitution de l'amidon et son degré de gonflement peut permettre un accès favorable de l'enzyme vers ses sites d'hydrolyse. En effet, l'alpha-amylase présente dans le milieu de dissolution est en contact avec les comprimés seulement à leur surface, et cette couche de gel hydratée empêche la pénétration de l'alpha-amylase à l'intérieur du comprimé. Ainsi, en présence de l'alpha-amylase pancréatique, les comprimés à base de CMA ont libéré plus rapidement les *fimbriae* F4 (Figure 5.4). Il semble que les *fimbriae* F4 sont libérées de la matrice de CMA sans avoir une interaction entre l'excipient et la sous-unité majeure FaeG des *fimbriae*, fait qui est probablement dû au faible degré de substitution du CMA utilisé dans l'étude. L'analyse des images des gels a montré que les sous-unités majeures des *fimbriae* F4 non-formulées présentent une bonne stabilité dans le milieu intestinal simulé pour une période de 5 h (Figure 5.6). Cet aspect est important, car, une fois libérées de la matrice de CMA, les *fimbriae* F4 doivent présenter une certaine résistance à la présence des enzymes duodénales pour pouvoir adhérer aux récepteurs intestinaux et, ensuite, pour produire une réponse immunitaire.

Les études de gonflement et d'érosion des matrices à base de CMA (comprimés monolithiques) ont mené à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la libération des *fimbriae* (Figure 5.5). Durant le passage dans le milieu gastrique simulé, le comprimé à base de CMA forme à sa surface un gel qui va progresser avec

le temps vers le centre du comprimé. Au passage vers un milieu neutre ou basique, la grosseur de la couche de gel va augmenter au début dû au gonflement du comprimé, (Figure 5.5a) pour qu'elle puisse diminuer par la suite à cause de l'érosion enzymatique par l'alpha-amylase et de la dissolution de la matrice (Figure 5.5a,b). Il faut aussi préciser que le volume de gonflement des comprimés CMA augmente avec leur degré de substitution (Calinescu *et al.*, 2005). Ainsi, suite à l'échange protons/cations (Na^+), les chaînes de CMA avec des degrés élevés de substitution permettent la pénétration des volumes d'eau plus grands que dans le cas des CMA avec des degrés plus faibles de substitution. Ainsi, les profils de libération du CMA ont à la base:

- i) un gonflement du comprimé (surtout au passage du pH acide au pH alcalin/intestinal), ce qui génère
- ii) une hydrolyse enzymatique du comprimé et
- iii) une dissolution rapide avec une accélération du taux de libération de l'agent actif.

Donc, à la base de ce comportement du CMA, il y a deux mécanismes: un mécanisme de contrôle chimique et un mécanisme de contrôle enzymatique. La nouveauté de notre système CMA consiste dans le fait que: (i) la matrice à base de CMA peut protéger les *fimbriae* F4 dans les conditions acides/enzymatiques du milieu gastrique sans avoir le besoin d'enrober la matrice, et (ii) le CMA peut délivrer l'agent actif par des mécanismes d'hydratation, de dissolution et d'érosion dépendants de pH et avec une vitesse augmentée par l'action de l'alpha-amylase pancréatique.

Pour retarder la livraison d'un agent actif dans l'intestin, surtout dans le cas de ciblage du côlon, l'association du CMA (anionique) avec le chitosane (cationique) sous forme des comprimés monolithiques a été proposée. Ces nouvelles matrices permettent le transport des agents bioactifs (*i.e.* probiotiques, enzymes thérapeutiques), en retardant leur livraison. Ainsi, la simple association des poudres d'excipients de CMA et chitosane a permis l'obtention d'un nouveau système polymérique stabilisé par des

interactions physiques et chimiques. Le comportement différent et complémentaire de ces deux polymères (*CMA*: structure compactée au pH acide et qui se solubilise dans le milieu intestinal; *chitosane*: soluble au pH acide et insoluble au pH intestinal) a permis de moduler et d'améliorer réciproquement la libération du probiotique *L. rhamnosus* et des enzymes thérapeutiques, la diamine oxydase (DAO) et la catalase (Calinescu et Mateescu, 2008; Calinescu *et al.*, article soumis).

L'étude de formulation du *L. rhamnosus* avec CMA:Chitosane, pour livraison au niveau du côlon (Chapitre VI; Calinescu et Mateescu, 2008), représente une continuation du travail réalisé sur la formulation d'*Escherichia coli* à base de CMA. La nouveauté de cette formulation consiste dans l'association du CMA avec le chitosane, en obtenant une matrice stable de type CMA:Chitosane qui assure une certaine protection gastrique de l'agent bioactif et qui retarde son libération. Le chitosane, grâce à sa nature cationique, a été déjà associé avec plusieurs polymères anioniques (*i.e.* alginate, xanthane) possédant des fonctions carboxyliques (Miyazaki *et al.*, 1995; Chellat *et al.*, 2000). Malgré le faible degré de substitution du CMA utilisé dans notre étude (DS 0.25), une certaine stabilisation de la matrice CMA:Chitosane a été observée dans les conditions gastro-intestinales. Cette stabilisation peut être de nature physique (par la formation du gel de chitosane à l'extérieur des comprimés) et chimique, partiellement due à une possible interaction ionique *in situ* entre les groupes carboxyle du CMA et les groupes amine du chitosane. Cette interaction apparaît probablement surtout à la surface des comprimés à base de CMA:Chitosane.

Il est connu que le chitosane peut retarder la libération des principes actifs (Kristl *et al.*, 1993). Nous avons montré qu'un choix adéquat de la quantité et de la masse moléculaire du chitosane dans un comprimé monolithique de type CMA:Chitosane peut moduler la libération des bactéries lactiques. Ainsi, pour les comprimés monolithiques à base de CMA:Chitosane, l'augmentation du pourcentage et de la masse moléculaire du chitosane a généré une diminution de la quantité des bactéries

libérées (Tableau 6.1). Notre étude a montré que la masse moléculaire de chitosane la plus élevée ($2,2 \times 10^6$ g/mol) retardait le plus le processus de libération des bactéries dans le milieu intestinal simulé (Figure 6.1). Les résultats obtenus concordent avec d'autres résultats publiés sur le chitosane (Kristl *et al.*, 1993). Le chitosane est connu comme ayant un caractère cationique dans un milieu acide, qui dépend de son degré de deacétylation (Rinaudo, Pavlov et Desbrieres, 1999). Ainsi, la présence des groupes amine chargés positivement permet au chitosane de former facilement des gels. Dans ces conditions, les comprimés monolithiques à base de chitosane présentent à leur surface une couche d'hydrogel protectrice qui empêche la pénétration de l'acidité au cœur du comprimé. Cette barrière de gel de chitosane, formée dans les conditions acides, contribue au retardement de la livraison des bactéries. Le retardement peut être modulé par la masse moléculaire du chitosane pour les formulations contenant le même pourcentage de chitosane (Figure 6.1). Les masses moléculaires élevées de chitosane retardent plus efficacement la libération d'un agent actif (Kristl *et al.*, 1993) à cause de l'augmentation de la consistance des gels formés par chitosane. Les mécanismes de libération des bactéries à partir des comprimés monolithiques CMA:Chitosane sont représentés par le gonflement des comprimés, dû au chitosane, et par l'érosion et la dissolution du CMA. Le chitosane est un polymère hydrophile qui retient l'eau dans sa structure en formant des gels, surtout dans un milieu acide. Ainsi, après avoir gardé les comprimés 1 h dans un milieu gastrique simulé (USP, 2000), le gonflement des comprimés monolithiques dans un milieu intestinal simulé (USP, 2000) a augmenté avec l'augmentation de la masse moléculaire du chitosane tant pour les formulations à base de 100% chitosane que pour celles à base de 50% CMA:50% Chitosane (Figure 6.2). La présence du CMA dans la matrice a contribué à l'augmentation de l'érosion de la matrice CMA:Chitosane (Figure 6.3), une quantité plus élevée des bactéries étant ainsi libérée. Un avantage important de l'utilisation du chitosane comme faisant partie d'un système de transport et livraison au niveau du côlon est représenté par sa stabilité à la présence des enzymes pancréatiques et par une certaine dégradabilité à la présence des enzymes bactériennes du côlon (Zhang et Neau, 2002).

Plusieurs polymères hydrophiliques peuvent adhérer à la surface des muqueuses par des mécanismes d'adhésion, *i.e.* adhésion par hydratation, où des ponts d'hydrogène entre le polymère adhérent et le mucus sont impliqués (Peppas et Buri, 1985). Dans le cas du chitosane, d'autres interactions, *i.e.* interactions ioniques, entre les groupes amine chargés positivement du chitosane et certains résidus chargés négativement de la mucine (*i.e.* acide sialique) peuvent aussi être impliquées (Allen, 1978; Deacon *et al.*, 2000). Lorsque le mécanisme d'adhésion du chitosane implique des interactions électrostatiques, le pH joue un rôle important. Ainsi, ces interactions peuvent être fortes dans un milieu acide (He, Davis et Illum, 1998). L'association du CMA au chitosane (sous forme de comprimé monolithique CMA:Chitosane) pourrait contribuer à la diminution des propriétés adhésives du chitosane au niveau gastrique, ce qui présente un avantage, favorisant ainsi le transport du comprimé au niveau intestinal, due à la diminution du nombre des groupes amine disponibles.

La présence du double-noyau à base de CMA sur les comprimés monolithiques CMA et/ou Chitosane empêche le contact de l'acidité avec le chitosane et, ainsi, la formation du gel de chitosane, tel qu'il a été montré par les études de microscopie électronique (Figure 6.5). La couche externe de CMA est érodée, ce qui permet l'hydratation du comprimé CMA/Chitosane situé à l'intérieur, suivie par l'érosion et la dissolution du CMA présent dans le comprimé CMA:Chitosane. Ceci a un impact direct sur la libération des bactéries qui consiste dans une libération plus rapide des bactéries et dans des quantités plus élevées dans le milieu qui simule les conditions intestinales, même pour les comprimés monolithiques contenant 100% chitosane de masse moléculaire élevée (Figure 6.4). Tel qu'il a été aussi montré par Akbuga (1993), le chitosane ne présente pas des propriétés de retardement des agents actifs à un pH neutre. La couche externe de CMA a protégé contre l'acidité le comprimé à base de CMA/Chitosane, qui est situé à l'intérieur de la formulation double-noyau, et, tant que l'acidité ne vient pas en contact avec le chitosane, le gel de chitosane ne peut pas se former pour retarder la libération des bactéries.

Pour avoir une bonne efficacité, les probiotiques devraient être implantés au niveau de l'intestin, tout en restant viables pour pouvoir exercer leur actions bénéfiques (Chapitre III, section 3.2). Le chitosane est connu pour son effet antibactérien surtout dans un milieu acide à cause de la présence des groupes amine chargés positivement qui peuvent interagir avec les groupes anioniques présents à la surface des cellules bactériennes (Helander *et al.*, 2001). Ainsi, la viabilité bactérienne est réduite en présence de chitosane, surtout si celui-ci se présente sous forme de solution. Dans notre système, l'effet antibactérien du chitosane est diminué et il est probablement limité à la surface des comprimés monolithiques où l'acidité entre en contact direct avec le chitosane (groupes amine chargés positivement). Toutefois, les possibles interactions entre les groupes *amine* du chitosane et les groupes *hydroxyle* ou *carboxyle* du CMA (ponts d'hydrogène) et entre les groupes *amine* du chitosane et les *fonctions carboxyliques* du CMA (interactions ioniques) contribuent à la diminution du nombre des groupes *amine* libres et, ainsi, à la diminution de l'effet antibactérien du chitosane. De plus, l'effet antibactérien du chitosane peut aussi être diminué par l'existence des possibles interactions entre le chitosane et différents autres composés présents dans le milieu de dissolution (*i.e.* pancréatine), tel qu'il a été suggéré par Gil et ses collaborateurs (2004).

L'utilisation des matrices à base de 100% CMA n'est pas avantageuse pour la livraison des agents bioactifs au niveau du côlon. Ceci est dû à l'érosion et à la dissolution rapide de la matrice à base de CMA, érosion qui peut être augmentée par la présence de l'alpha-amylase. Différemment, pour ce qui concerne les matrices à base de chitosane, une libération déficiente de l'agent bioactif dans le milieu intestinal simulé a été observée. Ainsi, les matrices à base de 100% chitosane avec une masse moléculaire de $6,3 \times 10^5$ g/mol, 9×10^5 g/mol et $2,2 \times 10^6$ g/mol ne permettaient pas une bonne libération des bactéries, une quantité appréciable des bactéries vivantes étant retenue à l'intérieur de ces comprimés monolithiques même après 24 h d'incubation dans un milieu intestinal simulé. La présence de CMA favorise la libération de l'agent

actif. Un avantage important du chitosane pour sa possible utilisation comme système de transport au niveau du côlon est représenté par sa susceptibilité à une certaine dégradation par les enzymes produites par les bactéries présentes au niveau du côlon (Tozaki *et al.*, 1997; Zhang et Neau, 2002). Les résultats de cette étude ont été obtenus dans des conditions intestinales simulées ne contenant pas des enzymes spécifiques pour la dégradation du chitosane. Ainsi, en présence de la microflore intestinale, une quantité plus grande des bactéries pourra être libérée au niveau du côlon une fois que le comprimé arrive à cet endroit.

Le recouvrement des formulations pharmaceutiques avec un enrobage entérique est fréquemment utilisé pour la livraison des principes actifs au niveau du côlon. En général, l'enrobage entérique est résistant dans les conditions gastriques et peut se dissoudre à un pH plus élevé de l'intestin. Le matériel le plus utilisé actuellement est représenté par des polyméthacrylates (*i.e.* Eudragit®). D'autres matériaux utilisés pour la livraison ciblée au niveau du côlon sont représentés par des dérivés de la cellulose (*i.e.* éthyl cellulose) qui couvrent des capsules pouvant se défaire à différents pressions en fonction de la grosseur des enrobages. D'autres systèmes à libération au niveau du côlon (*i.e.* systèmes à base d'azo-polymères) ont été aussi évalués comme des matériaux d'enrobage dû à leur biodégradabilité par la microflore intestinale (Section 2.2.1.4).

Le chapitre VII présente une méthode zymographique modifiée pour la détection de l'activité enzymatique de la DAO (*Lathyrus sativus*) sur des gels de polyacrylamide (SDS-PAGE) contenant la peroxydase immobilisée (Calinescu *et al.*, 2010). Comme le peroxyde d'hydrogène est le produit de la majorité des oxydases, les portions de gel où la DAO se retrouve après la séparation électrophorétique peuvent être visualisées par une réaction couplée à la peroxydase. Ainsi, à la base de cette méthode se trouvent deux réactions enzymatiques couplées: *la première réaction*, catalysée par DAO, avec l'obtention d'un aldéhyde, de l'ammoniaque (NH₃) et du peroxyde d'hydrogène

(H_2O_2), et la deuxième réaction, catalysée par la peroxydase, qui utilise le H_2O_2 produit de la première réaction pour former l'azo-aniline en présence de l'ortho-phénylenediamine (OPDA). À notre connaissance, cette étude est le premier essai de zymographie d'une oxydase (DAO végétale en présence de SDS), avec la deuxième enzyme (peroxydase) immobilisée dans le gel de polyacrylamide (Schéma 9.1).

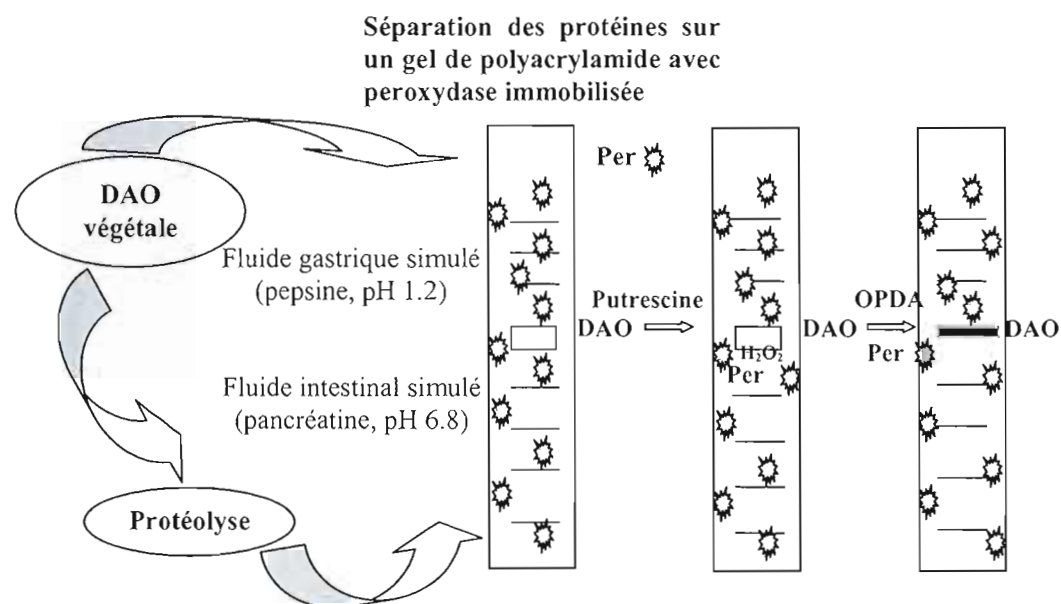


Schéma 9.1: Représentation schématique du principe de la méthode zymographique modifiée.

D'autres études zymographiques sur les amine oxydases ont été rapportées dans la littérature (Houen et Leonardsen, 1992; Lee, Chuang et Hou, 2002), et dans ces études, les gels obtenus après la migration électrophorétique étaient exposés à une solution de peroxydase pour pouvoir détecter l'activité amine oxydasique. La nouveauté de cette procédure zymographique est notamment la présence de la peroxydase à l'intérieur du gel d'électrophorèse, en l'immobilisant *in situ* durant le processus de polymérisation des gels de polyacrylamide. L'hémine, une molécule non-enzymatique (protoporphyrine IX contenant fer), a été aussi utilisée à la place de peroxydase pour la détection des oxydases dans des études de zymographie (Mateescu *et al.*, 2011). En effet, des résultats semblables ont été obtenus avec l'hémine immobilisée dans des gels de polyacrylamide, l'hémine étant apte de catalyser des réactions de plusieurs chromogènes avec H_2O_2 (Brusova et Magner, 2009). Les études de littérature ont rapporté une certaine instabilité des bandes obtenues sur des gels d'électrophorèse avec l'utilisation des différents co-substrats de la peroxydase, les bandes devant être stabilisées par d'autres traitements (Fieldes, 1992; Iida *et al.*, 1990). Dans cette étude, l'OPDA a été proposée comme co-substrat pour la peroxydase, avec la formation d'un produit stable, l'azo-aniline, qui peut être visualisé facilement sur gels.

Plusieurs études ont montré l'effet bénéfique de la DAO végétale dans la réponse anaphylactique cardiaque (Masini *et al.*, 2002), ischémie et réperfusion cardiaque (Masini *et al.*, 2003) ou asthme (Masini *et al.*, 2004). La DAO pourrait avoir des effets bénéfiques dans d'autres pathologies, comme celles de l'intestin, par son action histaminasique et par son rôle d'antioxydant. Dans ce contexte, pour l'administration de la DAO par la voie orale, sa stabilité en présence des enzymes digestives (pepsine, pancréatine) a été étudiée en utilisant la méthode zymographique modifiée, avec la peroxydase immobilisée sur des gels de polyacrylamide (Calinescu *et al.*, 2010).

L'extrait végétal provenant du *L. sativus* présente un profil électrophorétique avec une bande majeure (coloration Coomassie) qui correspond à une seule bande

zymographique identifiée comme DAO, dont l'intensité augmente d'une façon linéaire avec la concentration d'extrait végétal (Figure 7.1). L'étude a montré que la DAO peut retenir partiellement son activité enzymatique en présence de SDS, et que, dans ces conditions, il y avait une certaine stabilisation de l'activité enzymatique de la DAO pour plus de 2 h (Figure 7.2). Cette stabilisation de l'activité enzymatique de la DAO en présence de SDS est importante, car la révélation de l'activité enzymatique de la DAO sur des gels de polyacrylamide a été réalisée après 75 min d'électrophorèse et durant 60 min d'incubation. À date, il n'y a pas d'études sur la stabilité de la DAO en présence de SDS. Différemment, il est déjà connu que la peroxydase est une des enzymes qui sont inactivées très lentement par la présence de SDS. Il a été suggéré que les deux ions de calcium, qui se trouvent dans la structure de la peroxydase, pourraient être impliqués dans la stabilité de la peroxydase au SDS, car, en présence d'EDTA (1 mM), qui peut lier les ions de calcium, la peroxydase perd son activité enzymatique beaucoup plus rapidement en présence de SDS (Gebicka *et al.*, 1999).

Concernant les études de protéolyse, les résultats obtenus ont montré: i) une sensibilité élevée de la DAO végétale à l'acidité gastrique et à la présence de la pepsine (Figure 7.3), et ii) une certaine stabilité à la protéolyse par des enzymes pancréatiques (trypsine, chymotrypsine, endopeptidases, exopeptidases, carboxypeptidases) durant 10 h d'incubation, à 37 °C (Figures 7.4, 7.5). Après 10 h d'incubation en présence de pancréatine, le contenu en protéine de la DAO purifiée et, respectivement, son activité enzymatique, ont diminué plus que dans le cas de la DAO provenant de l'extrait végétal (non-purifié). La DAO purifiée semblait donc plus susceptible à la protéolyse que la DAO contenue dans l'extrait végétal. Sa meilleure résistance à la protéolyse pourrait être expliquée par une certaine protection de la DAO par d'autres protéines présentes dans l'extrait végétal.

L'étude de Federico et ses collaborateurs (2000) a aussi rapporté une certaine sensibilité de la DAO végétale (provenant des germes de *Pisum sativum*) à la présence

de la pepsine. Ainsi, la DAO végétale retenait seulement 14% de son activité enzymatique après 30 min d'incubation dans un milieu acide (pH 2) contenant 0.01% pepsine (4500 U/mg). Notre étude a montré que, dans des conditions plus drastiques (pH 1.2, 0.32% pepsine avec 882 U/mg protéine), seulement après 15 min d'incubation, il y avait la dégradation totale de la DAO et des autres protéines contenues dans l'extrait végétal (Figure 7.3). Pour ce qui concerne le milieu intestinal, l'étude de Federico a réalisé une incubation de l'enzyme végétale seulement pour 1 h en présence de la trypsine. La DAO végétale immobilisée a eu une stabilité augmentée à l'attaque protéolytique tant dans le milieu contenant la pepsine que dans celui contenant la trypsine (Federico *et al.*, 2000). Des études de protéolyse sur d'autres amine oxydases d'origine animale (*i.e.* amine oxydase sérique bovine, DAO provenant des reins de porc) ont montré une perte partielle de leur activité enzymatique au début de la période d'incubation avec des enzymes protéolytiques (*i.e.* trypsine, pronase ou thermolysine), suivie par une certaine stabilisation de leur activité enzymatique (Mondovi, Befani et Mateescu, 1992; Mateescu, Befani et Mondovi, 1993). La présence des carbohydrates dans leur structure semble de conférer une stabilité plus élevée à la présence des dénaturants (*i.e.* une stabilité augmentée à la protéolyse). Dans notre étude, une certaine stabilité de la DAO végétale à la présence de la pancréatine, contenant plusieurs enzymes (trypsine, chimotrypsine, endopeptidases, exopeptidases), a été aussi montrée (Figures 7.4 et 7.5). Cette stabilité enzymatique de la DAO à la présence des enzymes pancréatiques peut être intéressante pour une éventuelle application thérapeutique de la DAO.

Plusieurs oxydases à cuivre, avec divers effets bénéfiques, ont été identifiées. Ainsi, il a été montré que l'amine oxydase sérique, une protéine à cuivre, peut avoir un rôle anti-tumoral (Mondovi, Gerosa et Cavaliere, 1982; Mondovi *et al.*, 1994; Averill *et al.*, 1993) et peut être un antioxydant intéressant avec la capacité de réduire les dommages oxydatifs cardiaques (Mateescu *et al.*, 1997; Mateescu et Nadeau, 2009; Mondovi *et al.*, 1997). Une autre protéine à cuivre, la céruloplasmine présente les

mêmes effets antioxydants et de cardioprotection (Dumoulin *et al.*, 1996; Atanasiu *et al.*, 1998). La DAO d'origine végétale a été aussi identifiée et proposée pour le traitement de différentes conditions pathologiques (*i.e.* allergies, anaphylaxie, dermatite atopique) dans lesquelles l'histamine est impliquée (Mondovi *et al.*, 2002). Il a été montré que la DAO d'origine végétale peut avoir un effet antioxydant comme la céruloplasmine et l'amine oxydase sérique en protégeant les cœurs de rat contre les dommages produits durant l'ischémie/réperfusion (Masini *et al.*, 2003), en ayant aussi un effet protecteur dans l'ischémie intestinale (Masini *et al.*, 2007). Dans ce contexte, comme pour les autres oxydases à cuivre, le rôle d'antioxydant de la DAO végétale peut s'ajouter à son activité histaminasique. Les deux rôles de la DAO peuvent être utiles dans la thérapie de plusieurs maladies entériques. Ainsi, dans la dernière partie du projet doctoral, nous proposons la DAO végétale comme agent bioactif pour le contrôle et la thérapie des maladies entériques (*i.e.* maladies inflammatoires de l'intestin, cancer intestinal). Ainsi, l'administration orale de la DAO, seule ou associée à la catalase, sous forme de formulations CMA:Chitosane (comprimés monolithiques) a été proposée (Chapitre VIII; Calinescu *et al.*, article soumis). En se basant sur les résultats obtenus dans l'étude de formulation des bactéries lactiques *L. rhamnosus* (Calinescu et Mateescu, 2008), le chitosane d'une masse moléculaire moyenne de 600 kDa a été choisi pour réaliser des formulations mono-enzymatiques (DAO ou catalase) et bi-enzymatiques (DAO et catalase) à base de CMA:Chitosane (1:1). Tels qu'il a été observé dans l'étude de formulation du *L. rhamnosus*, les comprimés monolithiques CMA:Chitosane, formulés avec différentes charges en DAO/catalase, forment une barrière de gel à leur surface (Figure 8.1) qui assure une certaine protection gastrique des agents bioactifs et, respectivement, un certain retardement de la libération. De plus, la présence des protéines dans ces formulations peut aussi contribuer à assurer une certaine gastro-protection, à cause des possibles associations entre les protéines (intra- et inter-chaînes), fait qui est plus relevant pour les charges élevées en catalase. Le comprimé à base de 100% extrait végétal contenant la DAO, avec moins de protéines

totales/mg poudre que la poudre de catalase et avec un contenu assez élevé des phosphates, n'a pas été stable dans le milieu gastrique.

En général, dans les études rapportées dans la littérature, la DAO a été administrée sous forme immobilisée. Ainsi, pour une meilleure utilisation thérapeutique de la DAO végétale, l'équipe de Federico (Federico *et al.*, 2006) a proposé l'utilisation du complexe DAO-Polyéthylenglycol qui présente une meilleure résistance à la protéolyse suite à son administration intrapéritonéale, avec l'élimination du comportement immunogène de la DAO. La DAO a été aussi immobilisée sur Concanavalin A – Sepharose, et cette immobilisation a augmenté de façon inattendue la susceptibilité de la DAO à la protéolyse (Mondovi, Befani et Mateescu, 1992). Toutefois, dans une étude de Fogel et Lewinski (2006), la DAO d'origine animale immobilisée sur Concanavalin A – Sepharose a été utilisée pour l'administration intrapéritonéale (sous forme de suspension) dans un modèle expérimental de colite ulcéreuse chez le rat. L'étude a montré certains effets bénéfiques de la DAO immobilisée sur les réactions inflammatoires intestinales. L'originalité de notre étude consiste dans la formulation de la DAO végétale sous forme de comprimés à base de CMA:Chitosane pour son administration par la voie orale, en assurant ainsi une livraison locale de cette enzyme, au niveau de l'intestin. Notre étude a montré que le temps de résidence gastrique constitue un facteur important dans le processus de libération de la DAO à partir de la matrice de CMA:Chitosane (Figure 8.2), grâce à la formation d'une quantité de gel variable à la surface des comprimés. Ainsi, la présence du chitosane dans la formulation CMA:Chitosane assurait déjà un retard dans la libération de la DAO après seulement 30 min d'incubation gastrique, comparativement avec la matrice à base de CMA qui libérait rapidement la DAO. En général, pour tous les temps d'incubation gastrique (30, 60, 120 min), une libération importante de la DAO était obtenue après 8 h, une période de temps qui est convenable pour que le comprimé puisse arriver au niveau du côlon. L'avantage de nos formulations CMA:Chitosane consiste dans leur stabilité gastrique et leur capacité de livrer la DAO

à des sites intestinaux spécifiques, libération qui peut être modulée en fonction de la masse moléculaire et du pourcentage de chitosane utilisé. Ainsi, ces formulations présentent des perspectives intéressantes à considérer pour les formes orales proposées de la DAO.

Une fois libérée, le rôle principal de la DAO consiste dans le contrôle du taux d'amines biogènes, en catalysant leur oxydation, avec l'obtention de l'aldéhyde correspondante, du H_2O_2 et du NH_3 . Plusieurs études ont montré que des niveaux élevés de polyamines sont caractéristiques aux cellules qui présentent un taux de prolifération élevé (Heby, 1989), et la modulation de l'activité enzymatique de la DAO peut jouer un rôle important dans le processus de régulation de la croissance cellulaire. En inhibant la DAO, une augmentation du taux de croissance tumorale a été observée (Kusche *et al.*, 1988). Le H_2O_2 , en fonction de sa concentration, peut contribuer à la diminution de la croissance cellulaire et de la prolifération, en contrôlant l'expression des gènes et la transduction des signaux cellulaires (Sen et Packer, 1996). Dans ce contexte, la DAO, une fois livrée au niveau intestinal, peut représenter un agent thérapeutique pour les cancers d'intestin.

Plusieurs études ont montré que la modulation de l'activité des Cu-AOs peut être réalisée par le H_2O_2 . Ainsi, Mondovi et ses collaborateurs (1967) ont déjà décrit l'inhibition du Cu-AO (DAO des reins de porc) par le H_2O_2 . Plus récemment, l'inhibition de l'amine oxydase sérique bovine (BSAO) par le H_2O_2 a été aussi décrite (Pietrangeli *et al.*, 2000). Dans ce contexte, l'association de la catalase à la DAO pourrait: (i) protéger la DAO de son inactivation par le H_2O_2 , en décomposant celui-ci au fur et à mesure qu'il est produit, et (ii) avoir des effets bénéfiques dans d'autres pathologies intestinales, comme les maladies inflammatoires de l'intestin, car la muqueuse intestinale peut être exposée au stress oxydatif durant l'inflammation. De plus, il est connu que la catalase est une enzyme qui est impliquée directement dans les systèmes de défenses antioxydantes au niveau de l'intestin grêle et/ou du côlon. Nous

avons montré que la présence de la catalase dans le même milieu réactionnel que DAO (les deux enzymes libres, non-formulées) peut contribuer à la décomposition du H_2O_2 produit par DAO en présence de putrescine (Figure 8.5a). L'oxygène libéré par la catalase pourrait s'ajouter à l'oxygène dans la réaction d'oxydation de l'amine biogène catalysée par la DAO, déplaçant ainsi l'équilibre en faveur de l'oxydation. Dans nos conditions, avec putrescine comme substrat, la quantité d'oxygène supplémentaire produite suite à la décomposition du H_2O_2 a été inférieure à la quantité d'oxygène dissoute dans le milieu réactionnel et cela n'a pas affecté l'activité enzymatique de la DAO (Figure 8.5b). Pour une éventuelle administration de la catalase par la voie orale, des études de formulation de la catalase, seule ou en association avec la DAO végétale, ont été réalisées. Nous avons montré que la formulation de la catalase sous forme de comprimés monolithiques à base de CMA:Chitosane a permis de garder une bonne activité enzymatique résiduelle de la catalase après le passage gastrique (Figure 8.3a). Le maintien de l'activité enzymatique résiduelle de la catalase formulée à un niveau relativement constant pour plusieurs charges en catalase (après l'incubation gastrique des comprimés) suggère que la catalase peut aussi s'auto-protéger par des possibles interactions protéine-protéine. Ce phénomène est plus évident pour les charges élevées en catalase (50% et 100% catalase). En effet, plusieurs études montrent l'utilisation des matrices à base de 100% protéines pour le transport des agents actifs au niveau du tractus gastro-intestinal, ces matrices protéiques pouvant assurer une certaine gastro-résistance des agents actifs (Caillard, Petit et Subirade, 2009; Chen et Subirade, 2009). Toutefois, dans notre étude, nous avons montré que les formulations avec des pourcentages élevés en catalase restreignent beaucoup la libération de la catalase dans le milieu intestinal simulé (Figure 8.3b). Ainsi, un certain rapport entre la catalase et les excipients polymériques devrait être maintenu pour assurer en même temps une bonne protection gastrique et un contrôle de la libération de la catalase durant l'incubation dans les milieux gastrique et intestinal. Concernant les formulations bi-enzymatiques à base de CMA:Chitosane (1:1, avec 20% DAO et 10% catalase), la présence de la DAO provenant de l'extrait végétal a contribué à une meilleure

libération de la catalase dans le milieu intestinal simulé (Figure 8.4). Ceci est probablement dû à la présence d'une certaine quantité de phosphates dans l'extrait végétal contenant la DAO qui peut augmenter la dissolution et, possiblement, au fait que les interactions de type protéine-protéine n'étaient pas encore représentatives au niveau du comprimé hydraté pour un pourcentage de 10% catalase. Cet effet était moins observé dans le cas des formulations bi-enzymatiques CMA:Chitosane (1 :1) contenant 20% DAO et 20% catalase, montrant que, à partir d'un certain pourcentage de catalase, les interactions de type protéine-protéine peuvent devenir représentatives et la libération de la catalase peut ainsi être limitée.

Pour une éventuelle administration *in vivo*, les formulations bi-enzymatiques DAO:Catalase à base de CMA:Chitosane devraient permettre la libération de ces deux enzymes d'une façon simultanée, pour que le H_2O_2 produit de l'activité enzymatique de la DAO (en présence de l'histamine) puisse être décomposé par la catalase. Ainsi, l'utilisation de l'essai avec la réaction couplée à la peroxydase (spécifique pour le H_2O_2) a mis en évidence une diminution apparente de l'activité enzymatique de la DAO, fait qui était dû à la décomposition du H_2O_2 par la catalase, suggérant une libération simultanée de ces deux enzymes dans le milieu intestinal simulé (Figure 8.6a; Chapitre VIII, Schéma 1a). Différemment, en utilisant la réaction enzymatique couplée au GDH, aucune diminution de l'activité enzymatique de la DAO n'était observée en présence de la catalase, dû au fait que le GDH est spécifique pour NH_3 et pas pour H_2O_2 (Figure 8.6b; Chapitre VIII, Schéma 1b). La formulation bi-enzymatique DAO:Catalase à base de CMA:Chitosane pourrait donc représenter une alternative pour mieux contrôler le processus d'inflammation qui apparait dans les maladies inflammatoires de l'intestin par la diminution de l'inflammation locale en dégradant l'histamine et par des effets antioxydants. La thérapie du cancer représente une autre possible application de la DAO.

Durant le projet doctoral, toutes les études *in vitro* ont été réalisées dans des milieux gastro-intestinaux simulés, *i.e.* fluide gastrique simulé pH 1.2, fluide intestinal simulé pH 6.8/7.5, tels que décrits par la Pharmacopée des États-Unis (USP, 1990, 2000). Une des limitations de cette étude a été représentée par le maintien constant des conditions de travail, tels que le pH des milieux de dissolution, leur composition, le volume, la vitesse d'agitation. *In vivo*, la variabilité du pH, la présence des sels biliaires dans la sécrétion pancréatique, la présence de la microflore intestinale du côlon, ainsi que d'autres facteurs, tels que la pression exercée par les contractions de l'estomac et/ou de l'intestin peuvent affecter les profils de libération des principes actifs étudiés dans ce projet. Ainsi, en absence de nourriture, le pH au niveau de l'estomac peut varier entre 1.4 – 2.1, le pH du duodénum entre 4.9 – 6.4, le pH du jéjunum entre 4.4 – 6.6, et le pH de l'iléum entre 6.5 – 7.4 (Oberle et Amidon, 1987). De plus, le volume de 50 mL utilisé pour réaliser les études *in vitro* semble inférieur à ce qu'il est disponible *in vivo* pour solubilisation et dissolution. Ainsi, le volume physiologique du petit intestin peut varier entre 50 – 1100 mL, avec en moyenne 500 mL en absence de la nourriture (Lobenberg et Amidon, 2000). Si le médicament est administré avec un verre d'eau, il sera immergé dans approximativement 250 mL de liquide au niveau de l'estomac, et, si le médicament ne se trouve pas sous forme de solution dans estomac, la vidange gastrique va contribuer à mettre le médicament en contact avec le fluide du petit intestin. Un autre facteur qui peut avoir une influence sur la solubilité du médicament est représenté par la présence des sels biliaires au niveau de la première partie du petit intestin (Fleisher *et al.*, 1999). Au niveau du côlon, les enzymes produites par la microflore intestinale (β -glucosidase, β -galactosidase, β -xylosidase, etc.) sont capables de métaboliser différents substrats (*i.e.* polysaccharides) qui ne sont pas digérés dans la partie supérieure du tube digestif.

Même si les deux milieux de dissolution utilisés (*i.e.* fluide gastrique simulé, fluide intestinal simulé) peuvent être adéquats pour réaliser des études *in vitro*, ces conditions ne sont pas suffisantes pour prédire la dissolution *in vivo*. Dans ce contexte, il pourrait

être nécessaire de développer des milieux de dissolution qui sont plus appropriés pour les conditions de dissolution *in vivo*. De plus, des études de scintigraphie s'avèrent nécessaires pour suivre le comportement des comprimés au niveau du tractus gastro-intestinal.

* * *

L'utilisation des matrices à base de CMA et de CMA:Chitosane pourrait présenter un grand intérêt dans l'industrie pharmaceutique dû au fait que l'amidon et le chitosane sont des polymères naturels, le CMA étant un dérivé d'amidon facile à produire. Le procédé de formulation est simple et susceptible à un passage rapide au développement industriel. Comme la vaccination orale est la plus efficace pour induire une réaction immunitaire mucosale, il y a toujours le besoin de développer des nouveaux systèmes de transport d'agents actifs au niveau intestinal. Dans ce contexte, la matrice à base de CMA peut permettre des développements majeurs pour la formulation des vaccins administrables par la voie orale. La matrice à base de CMA:Chitosane pourrait aussi constituer un système intéressant de transport et livraison des agents bioactifs pour la prophylaxie et/ou la thérapie de différentes maladies intestinales.

Des études *in vivo* chez le porcelet ont été déjà réalisées pour la formulation des *fimbriae* F4 à base de CMA, en collaboration avec Dr. Fairbrother, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, et les résultats semblent prometteurs. D'autres études *in vivo* seront nécessaires pour établir le possible rôle thérapeutique de la DAO végétale, associée ou non à la catalase, sous forme de formulation à base de CMA:Chitosane avec livraison au côlon.

ANNEXES

Contributions scientifiques: articles publiés et présentations aux congrès

Demande de brevet (formulations des enzymes thérapeutiques)



Carboxymethyl high amylose starch for F4 *fimbriae* gastro-resistant oral formulation

Carmen Calinescu^a, Éric Nadeau^b, Jérôme Mulhbach^a,
John Morris Fairbrother^b, Mircea-Alexandru Mateescu^{a,*}

^a Department of Chemistry and Centre BioMed, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. A, Montréal (Québec), Canada H3C 3P8

^b Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe (Québec), Canada J2S 7C6

Received 29 November 2006; received in revised form 8 April 2007; accepted 10 April 2007

Available online 24 April 2007

Abstract

The carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) was proposed as excipient able to protect F4 *fimbriae* oral vaccine against gastric acidity and pepsin, allowing its subsequent liberation in the intestinal fluid. Thus, F4 *fimbriae* formulated with CM-HAS as tablets displayed a markedly higher stability after 2 h of incubation in simulated gastric fluid (containing pepsin) than the free, non-protected F4 *fimbriae*, which, in these conditions, were almost completely digested after 120 min. In the presence of pancreatin (with alpha-amylase, lipase and proteolytic activities) in simulated intestinal conditions, the F4 *fimbriae* were liberated from CM-HAS tablets over a period of up to 5 h. The presence of pancreatin in intestinal medium did not affect the structural stability of the F4 *fimbriae* major subunits. Thus, F4 *fimbriae* formulated with CM-HAS would retain their receptor binding activity essential for the induction of an intestinal mucosal immune response.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Carboxymethyl high amylose starch; F4 *fimbriae*; Vaccine; Oral administration; Tablet; Gastro-resistance

1. Introduction

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is an important cause of disease in mammals, and, in the case of neonatal and recently weaned pigs, is responsible for diarrhea, reduced growth rate and mortality, with subsequent economic losses. ETEC bacteria adhere to the small intestinal epithelium by means of fimbrial adhesins, F4 being the most prevalent type of *fimbriae* in ETEC strains (F4⁺ETEC) causing neonatal and post-weaning diarrhea in pigs (Fairbrother and Gyles, 2006). F4 *fimbriae* are long filamentous polymeric surface proteins, mainly composed of FaeG subunits (fimbrial major subunit)

and low amounts of the fimbrial minor subunits FaeC (located at the tip), FaeF and FaeH (situated along the fimbrial structure) and probably FaeI and FaeJ (Bakker et al., 1992a). These *fimbriae* are responsible for bacterial adhesion to F4-specific receptors present on brush borders of villous enterocytes. The binding site of F4 *fimbriae* is situated on the FaeG major subunit (Bakker et al., 1992b), permitting F4⁺ETEC bacteria to withstand expulsion by intestinal peristalsis and to colonize the small intestine (Jones and Rutter, 1972). These bacteria produce enterotoxins which act on enterocytes, resulting in aqueous diarrhea (Nataro and Kaper, 1998). A prerequisite for ETEC infection is the presence of F4 receptors, piglets without this type of receptor being resistant to infection (Van den Broeck et al., 1999a).

One approach for the prevention of post-weaning diarrhea in pigs due to F4⁺ETEC would be oral vaccination with an F4 vaccine. Orally administered, purified F4 *fimbriae* were found to induce an intestinal mucosal immune response in F4 receptor-positive (F4R⁺) piglets (Van den Broeck et al., 1999a,b). This *in situ* mucosal immune response is not observed following parenteral immunization which activates the systemic immune system (Bianchi and Scholten, 1996). Thus, purified F4 *fimbriae*

Abbreviations: CM, carboxymethyl; CM-HAS, carboxymethyl high amylose starch (non-cross-linked); DS, degree of substitution; NMR, nuclear magnetic resonance; ETEC, enterotoxigenic *Escherichia coli*; SGF, simulated gastric fluid; SIF, simulated intestinal fluid; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; PBS, phosphate buffer solution; TBS, Tris buffer solution; TTBS, TBS solution containing 0.2% Tween-20; IOD, integrated optic density

* Corresponding author. Tel.: +1 514 987 4319; fax: +1 514 987 4054.

E-mail address: imateescu.m-alexandru@uqam.ca (M.-A. Mateescu).

can be considered as a suitable component of an oral vaccine for the blocking of subsequent adhesion of F4⁺ETEC.

Oral administration of F4 *fimbriae* in suspension is not cost-effective because of possible fimbrial denaturation by acids, bile and enzymes present in the gastro-intestinal tract (Snoeck et al., 2004). Oral administration of a solid formulation of the F4 *fimbriae* may result in a more effective vaccine, due to protection of the F4 *fimbriae* from the gastric pH and digestion by pepsin in the stomach. The purpose of F4 formulation with polymeric excipients would be to confer such a protection and, consequently, to decrease vaccine dose and dosing frequency. Delivery of F4 *fimbriae* to a specific absorption window rather than slow release throughout their passage in the gastro-intestinal tract is also a desirable outcome. As the F4 *fimbriae* each consist of many hundreds of identical monomer subunits, it is important that they be formulated with an appropriate polymeric matrix type that would also permit their liberation. Some F4 *fimbriae* multi-particulate formulations have been reported (Snoeck et al., 2003; Huyghebaert et al., 2005). To ensure gastro-resistance, these pellets were enteric-coated with Eudragit® (an anionic polymethacrylic acid), an additional step which complicates the manufacturing process. In addition, the release of F4 *fimbriae* from these enteric-coated pellets was not optimal because of subsequent interactions between the F4 *fimbriae* and the coating polymeric material (Huyghebaert et al., 2005). Consequently, there is a need for simple formulations of F4 *fimbriae*, possibly eliminating the coating process.

Starch is an attractive, cost-effective, safe (biocompatible) and renewable material. It is composed of amylose, a non-branched polymer of glucopyranose units with α -D-(1,4) glucosidic bonds, and of amylopectin, a branched polymer with α -D-(1,4) glucosidic bonds, having periodic branches at the O-6 position (Pazur, 1965). Native starch characteristics can be substantially changed by physical modification (i.e. gelatinization) (Svensson and Eliasson, 1995) or by chemical (Fang et al., 2004) or enzymatic (Rajan et al., 2006) alteration, leading to the acquisition of interesting properties as excipients for drug delivery systems (Dumoulin et al., 1999; Mulhbachter et al., 2001). Previous studies have shown the important role of hydroxylic groups in the organization of the cross-linked high amylose starch matrices (Mateescu et al., 1994; Dumoulin et al., 1998; Ispas-Szabo et al., 2000). In addition, we have shown that the presence of carboxymethyl groups (CM-) can also ensure a good stability of non-cross-linked starch matrices (Calinescu et al., 2005). Starch carboxymethylation results in water-soluble derivatives whose properties are mainly determined by the total degree of substitution. Due to the presence of carboxylic functional groups, the swelling properties of carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) are influenced by the environmental pH (Mulhbachter et al., 2004). In an acidic simulated gastric fluid (SGF), the CM-HAS matrix will become protonated, thus ensuring gastro-resistance of bioactive agents to acidic/enzymatic media. In neutral or weak alkaline simulated intestinal fluid (SIF), the protonated form will exchange the protons for cations, facilitating the hydration and dissolution of the polymeric matrix with the gradual release of the bioactive agent. Matrices (e.g. tablet form) based on CM-HAS may represent a viable solution

for the transport of bioactive agents in the gastro-intestinal tract. This excipient has already been successfully used *in vitro* for the gastric protection and delivery of large size bioactive agents such as *E. coli* microorganisms (Calinescu et al., 2005).

The aim of this study is to evaluate whether a matrix (tablet) based on CM-HAS as excipient can also confer gastric protection and permit intestinal delivery of bioactive agents smaller in size, such as peptide aggregates.

2. Materials and methods

2.1. Materials

High amylose corn starch (Hylon VII) was obtained from National Starch (NJ, USA); pepsin A from porcine gastric mucosa (Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO, USA); pancreatin (porcine pancreas) eight times strength (with alpha-amylase, lipase and proteolytic activities) from A&C American Chemicals Ltd. (Montreal, Quebec, Canada); acrylamide, *N,N'*-methylene-bis-acrylamide, protein molecular weight markers (broad range) from Bio-Rad Laboratories (Richmond, VA, USA); Western blotting membranes and ECLTM (enzymatic chemiluminescence) reagents from Amersham Pharmacia Biotech (NJ, USA); hyperfilmTM, X-ray film cassettes, electrophoresis (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratory) and Western blotting (W.E.P. Company, Seattle, WA, USA) systems.

Anti-F4 IgY primary antibody was produced by the Reference Laboratory for *Escherichia coli* (Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada); horseradish peroxidase-labelled anti-IgY secondary antibody was obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, PA, USA).

Purified, freeze-dried F4 *fimbriae* were produced by the Reference Laboratory for *Escherichia coli* (Saint-Hyacinthe). The purity of the F4 *fimbriae* was assessed by electrophoresis on 12% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) using the Bio-Rad Mini-Protean II electrophoresis system.

The derivatization agent (monochloroacetic acid) and the other chemicals were all reagent grade and used without further purification.

2.2. Synthesis of CM-HAS polymeric material

The CM-HAS was synthesized by etherification of the starch with monochloroacetic acid in an alkaline reaction medium, as described previously by Schell et al. (1978), Mulhbachter et al. (2001) and Calinescu et al. (2005), with slight modifications.

An amount of 70 g of high amylose starch (Hylon VII) was suspended in 170 mL of distilled water and warmed at 50 °C under continuous stirring in a Hobart planetary mixer. In order to obtain a better etherification, a volume of 235 mL of an aqueous 1.45 M NaOH solution was added and the reaction medium was homogenized for 20 min at 50 °C for gelatinization. Subsequently, 55 mL of 10 M NaOH solution were added to the reaction medium to activate the starch, transforming it into a more reactive alkoxide form and favoring the nucleophilic substitution for carboxymethylation. Then, 45.5 g of monochloroacetic acid

(dissolved in a minimum volume of water) were added and the starch was allowed to react (1 h at 50 °C) with monochloroacetic acid under continuous stirring. At the end of reaction, the gel-slurry was neutralized with an acetic acid solution and acetone was slowly added to the neutralized suspension. Washing with acetone:water (60:40, v/v) of polymeric derivative was done as previously described (Calinescu et al., 2005). After repeating the filtration and resuspension operations, the CM-HAS gel-slurry was dried with pure acetone, held overnight to air at room temperature, ground in a blender, and then sieved to obtain a powder with particles granulometrically smaller than 300 μm . This powder was used to prepare the tablets. The residual moisture of the polymer powder was calculated based on the product weight loss after the drying of the powder (100 °C).

2.3. Determination of CM-HAS substitution degree

The presence of carboxylic groups was first assessed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). FTIR spectral analysis of the CM-HAS powder was carried out in potassium bromide (KBr) pellets, using a BOMEM (Hartmann & Braun) spectrometer (MB-series, Quebec, Canada). Spectra were collected at a resolution of 4 cm^{-1} at 25 °C.

The degree of substitution of the CM-HAS was determined by direct titration with sodium hydroxide and by ^1H nuclear magnetic resonance (NMR).

2.3.1. Direct titration

The carboxymethyl groups of the CM-HAS were first activated by conversion into the acidic (protonated) form by treatment of the polymer with a 1 M HCl solution. The protonated CM-HAS was then precipitated with acetone, filtered, washed with acetone and finally dried in oven (50 °C). The protonated powder of CM-HAS was dispersed in water and the carboxyl groups were titrated with a 0.1 N NaOH solution.

2.3.2. ^1H NMR measurements

In order to determine the CM-HAS functionalization pattern, NMR analysis was performed on CM-HAS samples that had been previously hydrolyzed with perchloric acid as described by Heinze et al. (1999). Briefly, 0.1 g of CM-HAS were dispersed in 1 mL HClO_4 (70%) and after 10 min (room temperature), 9 mL of distilled water were added. The sample was heated at 100 °C for 16 h, and then neutralized with 2 M KOH and kept overnight at 4 °C to allow complete precipitation of KClO_4 . The obtained solution was frozen and freeze-dried. The ^1H NMR analysis was carried out in deuterated dimethyl- d_6 sulfoxide (99.9 atom %D, CDN Isotopes, Quebec, Canada) at 90 °C. The NMR spectra were acquired on a 300 MHz Gemini-300 spectrometer (frequency of proton).

2.4. Tablet formulation of purified F4 *fimbriae* with CM-HAS

The tablets were produced by direct compression (Carver press) of mixed dry powders (CM-HAS and F4 *fimbriae*) at a compression force of 2.5 T/cm². Thus, 7 mg of lyophilized

powder of *fimbriae* (containing 2 mg of purified F4 *fimbriae*) were incorporated into CM-HAS tablets (total mass: 200 mg).

2.5. Stability of F4 *fimbriae* in simulated gastric fluid

Samples of free, lyophilized F4 *fimbriae* (7 mg of powder containing 2 mg of purified F4 *fimbriae*) were individually incubated in 30 mL of SGF (pH 1.2) containing 0.32% pepsin, 1.17 U/mg (USP, 1990) for 30, 60, 90 and 120 min under gentle rotation at 50 rpm and 37 °C (simulating the gastric passage). At the end of incubation, the pH of each sample was increased to 7.5 ± 0.1 by addition of 240 μL of 10 M NaOH and 19.76 mL of phosphate buffer solution (PBS), pH 7.4 (total volume: 50 mL) and the stability of the F4 *fimbriae* in SGF was checked. For the CM-HAS formulated F4 *fimbriae*, the tablets were incubated for a duration up to 120 min in the same SGF conditions. Tablets were then transferred in 50 mL of PBS solution (pH 7.4), crushed, and dissolved for 4 h in this solution (under gentle agitation at 4 °C).

After each period of incubation indicated above, the F4 *fimbriae* integrity was evaluated by SDS–PAGE (12%) followed by Western blotting analysis (Sections 2.8 and 2.9).

2.6. Delivery of formulated F4 *fimbriae* in simulated intestinal fluid

The CM-HAS formulated *fimbriae* were incubated for 1 h in 50 mL SGF containing 0.32% pepsin (pH 1.2) and then for 5 h in 50 mL of SIF (pH 7.5 ± 0.1), with or without pancreatin (USP, 1990), at 50 rpm and 37 °C. After every hour of SIF incubation, liberated F4 *fimbriae* were evaluated by SDS–PAGE for pancreatin-free SIF samples (Section 2.8) and by SDS–PAGE followed by Western blotting analysis for SIF samples containing pancreatin (Sections 2.8 and 2.9).

2.7. Free F4 *fimbriae* stability in simulated intestinal fluid

Unformulated (free) lyophilized F4 *fimbriae* (7 mg preparation containing 2 mg of purified *fimbriae*) were incubated for 5 h in 50 mL of SIF containing pancreatin, pH 7.5 ± 0.1 (USP, 1990) at 37 °C and 50 rpm. The F4 *fimbriae* stability in SIF was then evaluated hourly by SDS–PAGE (12%) followed by Western blotting analysis (Sections 2.8 and 2.9).

For free F4 *fimbriae* controls, 7 mg of lyophilized F4 powder (2 mg purified F4) were dissolved in 50 mL PBS solution (pH 7.4). In the case of F4 formulated with CM-HAS (control), the tablets were crushed in 50 mL PBS solution (pH 7.4) and then kept 4 h under agitation at 4 °C for CM-HAS complete dissolution.

2.8. Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis

Degradation of F4 *fimbriae* was evaluated using SDS–PAGE. For each of the previously described experiments, 10 μL of F4 *fimbriae* sample was treated (1:1, v/v) with electrophoresis loading buffer (0.12 M Tris–HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol,

10% β -mercaptoethanol and 0.004% bromophenol blue) and boiled for 2 min. A volume of 10 μ L of treated F4 sample was loaded onto a 12% polyacrylamide gel prepared by the method of Laemmli (1970) and run at room temperature for 1 h (120 V) using an electrophoresis buffer (0.025 M Tris–Base pH 8.3 containing 0.192 M glycine and 0.1% SDS). Molecular weight protein markers (Broad Range, Bio-Rad Laboratories), containing bromophenol blue, were loaded on each electrophoresis gel. Proteins were stained with R-250 Coomassie blue.

2.9. Western blotting analysis

After SDS–PAGE migration, gels were separately equilibrated for 5 min in a transfer buffer (0.025 M Tris–Base, 0.192 M glycine and 20% methanol, pH 8.1–8.4) under gentle agitation. The gels were then blotted onto activated 0.45 μ m polyvinylidene fluoride membranes by semi-dry transfer (1.25 h, 80 mA/gel). After the protein transfer process, the non-specific sites on the membrane were blocked (overnight, 4 °C, under gentle agitation) using 2.5% low fat dried milk dissolved in a Tris buffer solution (TBS: 0.015 M Tris–HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.5). Membranes were then washed once with TBS solution containing 0.2% Tween-20 (TTBS) and once with TBS solution only. For detection of F4 *fimbriae*, membranes were incubated for 2 h (under agitation, at room temperature) in the 2.5% low fat milk TBS solution containing anti-F4 IgY primary antibody (dilution 1:700). Then, membranes were incubated for 1 h in a TBS solution containing horseradish peroxidase-labelled anti-IgY secondary antibody (dilution 1:3500) in the same conditions as above. Between and after the two antibody incubation steps, membranes were washed first in TTBS and then in TBS, both for 5 min. The F4 *fimbriae*–antibody complexes were detected using an enzymatic chemiluminescence test (ECLTM) based on the oxidation of luminol by the horseradish peroxidase. The light produced by this chemiluminescent reaction was detected by a short exposure to a light-sensitive film, which was developed using an automated developer.

Densitometry analysis of bands was carried out using the Alpha Ease FCTM program (ChemilmagerTM 5500). For each band on the film, the program evaluated its surface (mm²) that was multiplied by its corresponding measured density, thus obtaining the integrated optic density (IOD). We determined the percentage of variation of band densities for every sample versus the standard, considering the standard (free or formulated F4 *fimbriae* in PBS, time zero) as 100%.

2.10. Water uptake and erosion of CM-HAS tablets

The water uptake and erosion of the CM-HAS matrices were determined under conditions similar to those described for the F4 *fimbriae* release study. Tracer-free CM-HAS weighed tablets (polymer only) were placed in flat-bottom dissolution vessels containing SGF medium (37 °C and 50 rpm). After 1 h in SGF, the CM-HAS tablets were transferred to 50 mL SIF medium with or without pancreatin (at 37 °C and 50 rpm). After each hour of incubation in SIF (with or without pancreatin), hydrated tablets were removed from the dissolution medium, blotted with tissue

paper to eliminate the excess surface water, then weighed and placed for drying in an oven at 50 °C. The remaining dry weight was determined until constant mass. Three different tablets were used for each time point ($n = 3$).

The percentage of water uptake, erosion and water in remaining tablet were determined gravimetrically and calculated according to Freichel and Lippold (2000), Kavanagh and Corrigan (2004) and Sungthongjeen et al. (2004):

$$\% \text{ Water uptake} = \frac{(W_{w(t)} - W_0)}{W_0} \times 100$$

$$\% \text{ Erosion} = \frac{(W_0 - W_{d(t)})}{W_0} \times 100$$

$$\% \text{ Water in remaining tablet} = \frac{(W_{w(t)} - W_{d(t)})}{W_{d(t)}} \times 100$$

where $W_{w(t)}$ is the weight of the wet tablet at time t , W_0 the initial dry weight of the tablet and $W_{d(t)}$ the remaining dry weight of the tablet at time t .

2.11. Statistical analysis

One-way Anova pair-wise comparisons test followed by Tukey honestly significantly difference (HSD) test were used. Statistical significance was assessed at $P \leq 0.01$.

3. Results and discussion

The CM-HAS properties are mainly related to the degree of substitution (DS), which is the average number of CM-groups bound per anhydroglucose unit with maximal (theoretical) DS = 3. In the present study, the total DS of the CM-HAS excipient was determined by two methods giving similar values: direct titration (DS 0.33) and ¹H NMR spectroscopy on a hydrolyzed CM-HAS (DS 0.38) (Table 1). ¹H NMR spectroscopy of a hydrolytically depolymerized sample of CM-HAS can also provide information on the partial substitution at the 2, 3 and 6 position of the repeating glucose unit and can be used for the direct quantitative evaluation of the DS. Our NMR analysis showed that a significantly preferred reaction occurred at O-2 in CM-HAS and that starch carboxymethylation proceeded in the order O-2 > O-6 > O-3 (Table 1), confirming the findings of Heinze et al. (2001) and Lazik et al. (2002). The assignments of peaks (Fig. 1) and the calculation of partial DS were carried out according to Lazik et al. (2002).

Table 1
Determination of the degree of substitution of non-cross-linked CM-HAS excipient

| Method | DS _{CM} | x_2 | x_3 | x_6 |
|---------------------------------|------------------|-------|-------|-------|
| ¹ H NMR ^a | 0.38 | 0.2 | 0.076 | 0.111 |
| Direct titration | 0.33 | – | – | – |

x_2 , x_3 , x_6 = positions 2, 3, 6 of the glucose repeating unit.

^a Functionalization pattern of CM-HAS determined by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy after hydrolytic chain degradation.

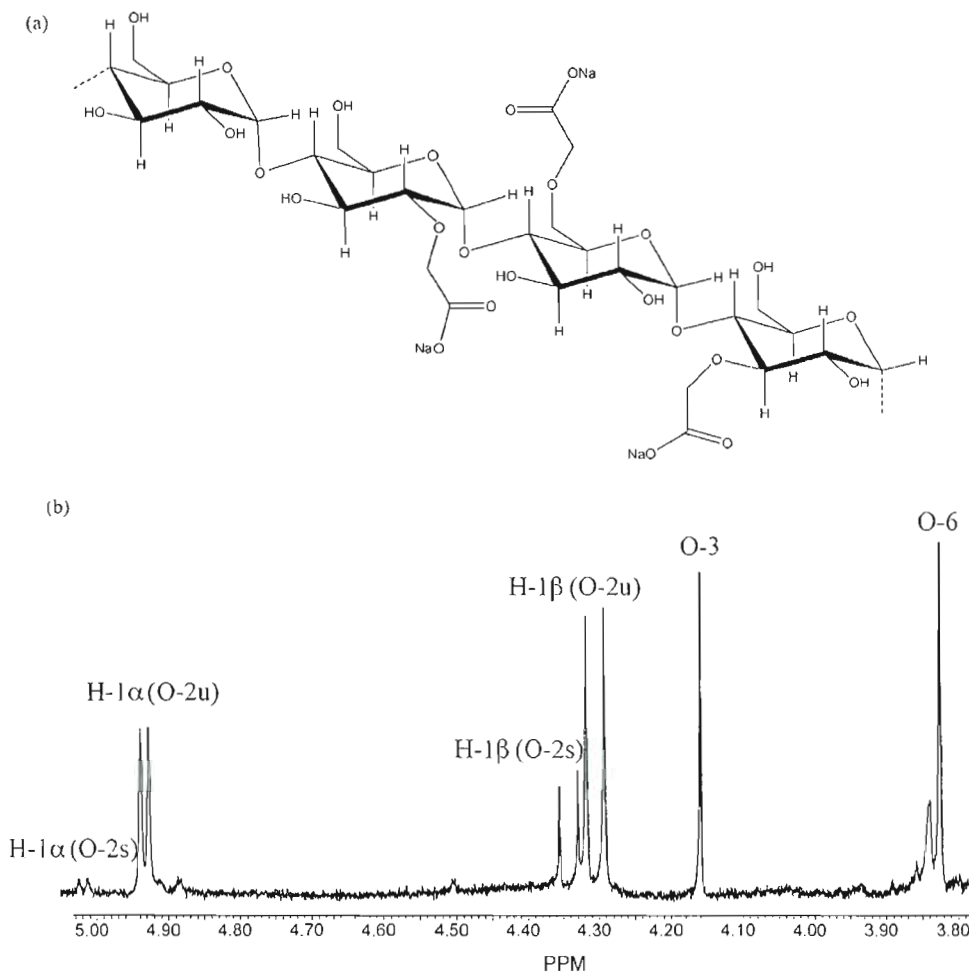


Fig. 1. ¹H NMR spectrum of CM-HAS after hydrolytic chain degradation. Schematic presentation of CM-HAS (a) and ¹H nuclear magnetic resonance spectrum (b). O is the oxygen atom at position *i* (*i* = 2, 3 or 6), H-1 is the hydrogen atom at the anomeric C (α, β-configuration of glucose). s means substituted, and u unsubstituted.

The residual moisture of the CM-HAS polymer powder was 11%, a value compatible with that of many starch derivatives. The FTIR spectroscopy in KBr yielded signals at 1607 and 1417 cm⁻¹ specific for a carboxylate salt (–COONa), confirming the presence of CM- functions on the high amylose starch (data not shown).

Purified F4 *fimbriae* have polymeric structures mainly composed of FaeG subunits. A prerequisite for the induction of an intestinal mucosal immune response is the preservation of the proper FaeG conformation or at least of its binding site to ensure the adherence of F4 *fimbriae* on the villous enterocytes in the small intestine. In our study, since the SDS–PAGE was performed with previously boiled F4 fimbrial samples, and because of the effect of SDS, only the FaeG monomeric major subunit degradation could be observed. These free FaeG monomeric major fimbrial subunits were partially degraded after 30–90 min of incubation in SGF containing pepsin (with proteolytic activity at pH 1.2) and almost completely digested after 120 min of treatment (Fig. 2a).

Gastric resistance of F4 *fimbriae* is also a prerequisite for its antigenicity. Since free F4 *fimbriae* are destroyed by pepsin, the

amount and/or integrity of antigen reaching the mucosal inductive sites could be reduced. When formulated with CM-HAS as tablets, the F4 *fimbriae* did not change markedly in their conformation since they were still recognized by their specific anti-F4 IgY antibodies. Additionally, SDS–PAGE and Western blotting tests showed that the CM-HAS polymeric matrix protected the *fimbriae* against gastric acid treatment and enzymatic denaturation (Fig. 2a and b), more than 90% of *fimbriae* being protected after 120 min of SGF treatment. This is a good protection efficacy when compared with that of the non-protected *fimbriae* (Fig. 2c). In this context, it is worth mentioning that is not necessary to apply an enteric coating on the CM-HAS matrix for a supplementary protection of the F4 *fimbriae*. The carboxylic groups are known for their ability to buffer and to create strong hydrogen bonds, ensuring thus a compact structure of the tablets in acidic conditions.

The delivery of the formulated F4 *fimbriae* was first observed after 2 h of treatment in pancreatin-free SIF (50 rpm, 37 °C) and continued for up to a further 3 h in the same SIF conditions (Fig. 3). In the presence of pancreatin (with alpha-amylase, lipase and proteolytic activities), the F4 *fimbriae* were liber-

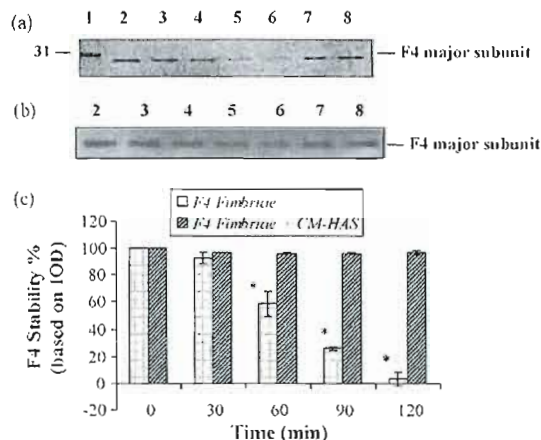


Fig. 2. Stability of F4 *fimbriae* in simulated gastric fluid (SGF/USP). (a) Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; (b) Western blotting; (c) densitometry analysis of Western blotting films. Electrophoretic profiles: molecular weight protein marker (31 kDa) (lane 1); free (non-formulated) F4 *fimbriae* in phosphate buffer solution (0 min) (2) and after 30 min (3), 60 min (4), 90 min (5), 120 min (6) in simulated gastric fluid containing pepsin (SGF); F4 *fimbriae* formulated with CM-HAS – as tablet – in phosphate buffer solution (0 min) (7) and after 120 min in SGF (8). Volume of *fimbriae* sample: 10 μ L/well; IOD, integrated optic density ($n = 3$). Asterisks stand for significant differences within the same group of samples ($P \leq 0.01$).

ated more rapidly (Fig. 4a–c). In order to understand the release mechanisms of formulated *fimbriae*, water uptake and erosion of CM-HAS matrices (containing the polymer only) were evaluated. It is known that starch gelatinization and derivatization generate a loss of crystalline order of starch grains (Dumoulin et al., 1998; Ispas-Szabo et al., 2000). Because of this loss of crystallinity, the water will enter more easily into the CM-HAS polymeric tablet. Thus, the contact of the non-cross-linked CM-HAS matrix with the dissolution medium results in hydration of the system. As the carboxymethylation process results in a water-soluble starch, hydration and dissolution of the matrix can occur at the same time as the erosion. The percentage of CM-HAS matrix water uptake and of erosion as a function of time, in the presence and absence of the pancreatin, are presented in Fig. 5. Initially, an increase in water uptake was observed during the first hour of SIF treatment, followed by a decrease

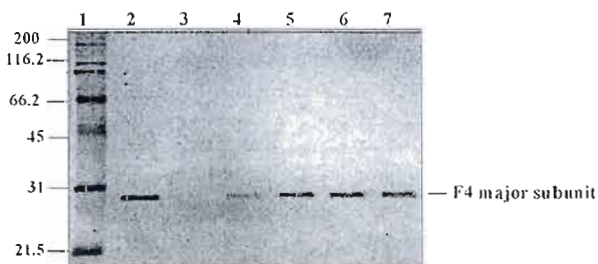


Fig. 3. Delivery of F4 *fimbriae* in pancreatin-free simulated intestinal fluid (SIF/USP). Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. Electrophoretic profiles: molecular weight protein markers (kDa) (lane 1); F4 *fimbriae* formulated with CM-HAS – as tablet – in phosphate buffer solution (0 min) (2), after 1 h in simulated gastric fluid (pepsin) and 1 h (3), 2 h (4), 3 h (5), 4 h (6), 5 h (7) in pancreatin-free simulated intestinal fluid. Volume of *fimbriae* sample: 10 μ L/well ($n = 3$).

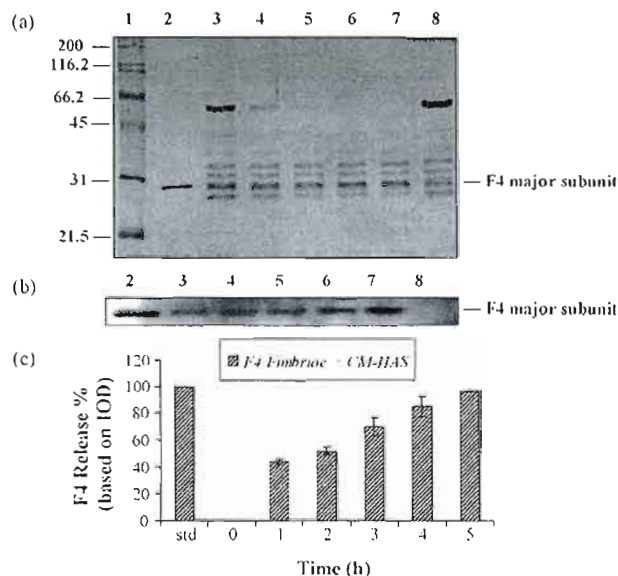


Fig. 4. Delivery of F4 *fimbriae* in simulated intestinal fluid containing pancreatin (SIF/USP). (a) Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; (b) Western blotting; (c) densitometry analysis of Western blotting films. Electrophoretic profiles: molecular weight protein markers (kDa) (lane 1); free (non-formulated) F4 *fimbriae* in phosphate buffer solution (0 min) (2); F4 formulated with CM-HAS after 1 h in simulated gastric fluid (pepsin) and 1 h (3), 2 h (4), 3 h (5), 4 h (6), 5 h (7) in simulated intestinal fluid containing pancreatin (SIF); SIF containing pancreatin only (8). Volume of *fimbriae* sample: 10 μ L/well; IOD, integrated optic density ($n = 3$).

of water uptake after 2 h of treatment (Fig. 5a). This could be due to dissolution and erosion (Fig. 5b) of the polymeric matrices. The presence of pancreatin (with α -amylase enzymatic activity) in SIF significantly increased the degradation rate of the modified starch compared with that in SIF in the absence of pancreatin, when the erosion rate of the matrix was lower (Fig. 5b). The fact that CM-HAS can act, within certain limits, as an α -amylase substrate is important since the delivery can be modulated by duodenal α -amylase. This behavior differentiates CM-HAS from other excipients (i.e. CM-cellulose). Therefore, due to erosion of polymeric matrix in the presence of pancreatin, the F4 *fimbriae* are liberated faster than in the SIF medium in the absence of pancreatin. Fig. 5c shows the water regain normalized as a percentage of water remaining in the CM-HAS tablets in function of time, with and without pancreatin. This normalization is required, considering the tablet erosion. In both cases, the plateau corresponds to the real time water content (%), taking into account the loss of tablet mass due to erosion. The hydration is very fast in the first hour (SIF), but after 2–3 h, the erosion became determinant, explaining the apparent decrease of water uptake (Fig. 5a) and plateau after normalization (Fig. 5c). At this stage, the water uptake by the tablet was accompanied by a water loss and matrix dissolution and erosion, keeping the water percentage in the remaining tablets constant. The CM-HAS matrices underwent hydration, dissolution and bio-erosion at the same time, thus explaining the negative values obtained at 4–5 h in the study of CM-HAS water uptake (Fig. 5a) in the presence of pancreatin.

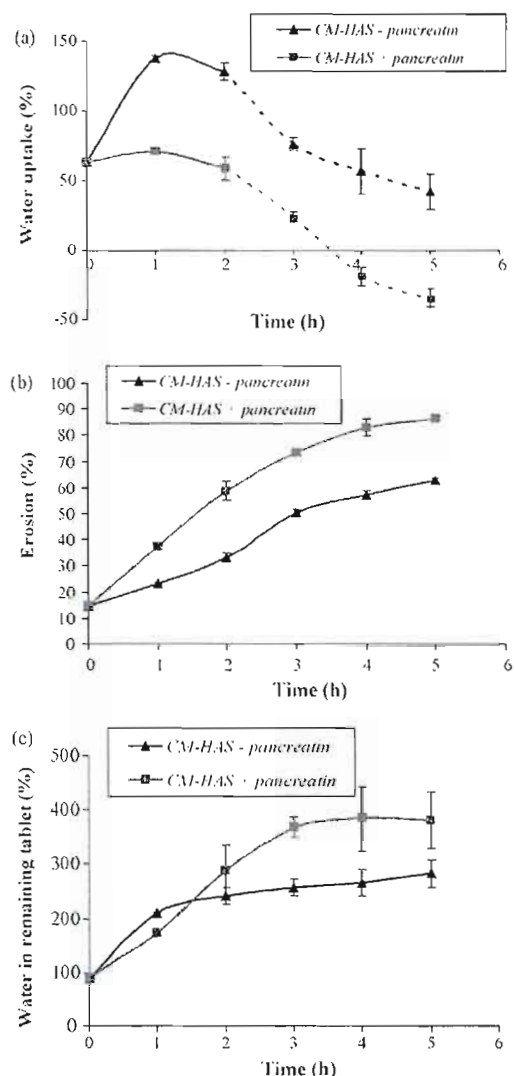


Fig. 5. Water uptake and erosion of CM-HAS tablet matrices. (a) Water uptake (%). (b) erosion (%) and (c) water normalized (%) for the mass of remaining eroded tablet. Tablets were treated for 1 h in simulated gastric fluid, followed by 5 h in simulated intestinal fluid with or without pancreatin ($n = 3$). Dashed line: decrease of water uptake due to dissolution and erosion of the polymeric matrices, which are faster than the swelling.

It was found that the presence of pancreatin in SIF does not affect the structural stability of the F4 *fimbriae* major subunits after 4–5 h of SIF treatment as shown by SDS-PAGE (Fig. 6a) and Western blotting (Fig. 6b). Statistical analysis using a one-way Anovapair-wise comparisons test followed by a Tukey HSD test showed that there were not statistically significant differences in terms of IOD between F4 *fimbriae* incubations at time 0 and after 4 and 5 h of treatment in SIF medium containing pancreatin (Fig. 6c). Therefore, the formulated *fimbriae*, once liberated in SIF, would retain their antigenicity and their receptor binding activity which are essential for the induction of an intestinal mucosal immune response. We will test the effect of this F4 formulation on the ability of orally administered F4 *fimbriae* on the induction of a localized mucosal specific IgM and IgA antibody response in the jejunum and ileum of weaned pigs,

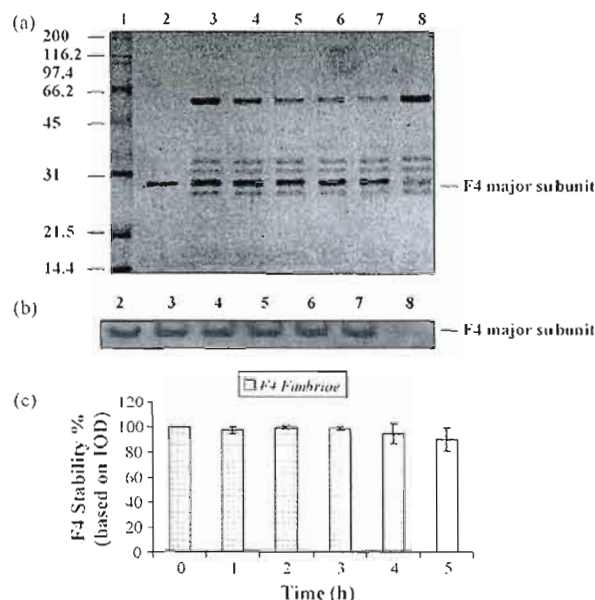


Fig. 6. Stability of F4 *fimbriae* in simulated intestinal fluid (SIF/USP). (a) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; (b) Western blotting; (c) densitometry analysis of Western blotting films. Electrophoretic profiles: molecular weight protein markers (kDa) (lane 1): free (non-formulated) F4 *fimbriae* in phosphate buffer solution (0 min) (2) and after 1 h (3), 2 h (4), 3 h (5), 4 h (6), 5 h (7) in simulated intestinal fluid containing pancreatin (SIF); SIF containing pancreatin only (8). Volume of *fimbriae* sample: 10 μ L/well; IOD, integrated optic density ($n = 3$).

which are the sites where most F4-positive ETEC colonization and induction of the physiological changes of diarrhea occur.

In conclusion, the CM-HAS hydrophilic polymer protected the F4 *fimbriae* against degradation by pepsin and conferred to the tablet formulation an appropriate combination of hydration, dissolution and erosion mechanisms allowing the delivery of a functional bioactive agent. The protection of F4 *fimbriae* by the CM-HAS biodegradable matrix could result in a more effective piglet vaccination than for the free F4 *fimbriae*, possibly due to a higher F4 antigen load in the jejunum of the pig. Further *in vivo* studies on piglets will give more answers on the conditions in which these formulations can protect the immunization capacity of F4 *fimbriae*.

Acknowledgements

This project was funded by Valorisation Recherche Québec (VRQ). The graduate studentship from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and FQRNT (Government of Québec, Canada) awarded to Carmen Calinescu are gratefully acknowledged. Thanks are due to Dr. Wilms E. Baille for helpful discussions on the NMR study.

References

- Bakker, D., Willemsen, P.T.J., Willems, R.H., Huisman, T.T., Mooi, F.R., Oudega, B., Stegehuis, F., Graaf, F.K., 1992a. Identification of minor fimbrial subunits involved in biosynthesis of K88 *fimbriae*. J. Bacteriol. 174, 6350–6358.

- Bakker, D., Willemsen, P.T.J., Simons, L.H., van Zijderveld, F.G., de Graaf, F.K., 1992b. Characterization of the antigenic and adhesive properties of FaeG, the major subunit of K88 *fimbriae*. *Mol. Microbiol.* 6, 247–255.
- Bianchi, A.T., Scholten, J.W., van Zijderveld, A.M., van Zijderveld, F.G., Bokhout, B.A., 1996. Parenteral vaccination of mice and piglets with F4+ *Escherichia coli* suppresses the enteric anti-F4 response upon oral infection. *Vaccine* 14, 199–206.
- Calinescu, C., Mulhbach, J., Nadeau, E., Fairbrother, J.M., Mateescu, M.A., 2005. Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipient for *Escherichia coli* oral formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60, 53–60.
- Dumoulin, Y., Alex, S., Szabo, P., Carlier, L., Mateescu, M.A., 1998. Cross-linked amylose as matrix for drug controlled release. X-ray and FT-IR structural analysis. *Carbohydr. Polym.* 37, 361–370.
- Dumoulin, Y., Carlier, L.H., Mateescu, M.A., 1999. Cross-linked amylose tablets containing α -amylase: an enzymatically controlled drug release system. *J. Control. Release* 60, 161–167.
- Fairbrother, J.M., Gyles, C.L., 2006. *Escherichia coli* infections. In: Straw, B.E., D'Allaire, S., Zimmerman, J.E., Taylor, D.J. (Eds.), *Disease of Swine*, vol. 38. Iowa State University Press, Ames, pp. 639–674.
- Fang, J.M., Fowler, P.A., Sayers, C., Williams, P.A., 2004. The chemical modification of a range of starches under aqueous reaction conditions. *Carbohydr. Polym.* 55, 283–289.
- Freichel, O.L., Lippold, B.C., 2000. A new oral erosion controlled drug delivery system with a late burst in the release profile. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 345–351.
- Heinze, Th., Pfeiffer, K., Liebert, T., Heinze, U., 1999. Effective approaches for estimating the functionalization pattern of carboxymethyl starch of different origin. *Starch/Stärke* 51, S. 11–16.
- Heinze, Th., Pfeiffer, K., Lazik, W., 2001. Starch derivatives with high degree of functionalization III. Influence of reaction conditions and starting materials on molecular structure of carboxymethyl starch. *J. Appl. Polym. Sci.* 81, 2036–2044.
- Huyghebaert, N., Snoeck, V., Vermeire, A., Cox, E., Goddeeris, B.M., Remon, J.P., 2005. Development of an enteric-coated pellet formulation of F4 *fimbriae* for oral vaccination of suckling piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 59, 273–281.
- Ispas-Szabo, P., Ravenelle, F., Hassan, I., Preda, M., Mateescu, M.A., 2000. Structure-properties relationship in cross-linked high-amylose starch for use in controlled drug release. *Carbohydr. Res.* 323, 163–175.
- Jones, G.W., Rutter, J.M., 1972. Role of the K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by *Escherichia coli* in piglets. *Infect. Immun.* 6, 918–927.
- Kavanagh, N., Corrigan, O.I., 2004. Swelling and erosion properties of hydroxypropylmethyl cellulose (Hypermellose) matrices—influence of agitation rate and dissolution medium composition. *Int. J. Pharm.* 279, 141–152.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lazik, W., Heinze, Th., Pfeiffer, K., Albrecht, G., Mischnick, P., 2002. Starch derivatives of a high degree of functionalization. VI. Multistep carboxymethylation. *J. Appl. Polym. Sci.* 86, 743–752.
- Mateescu, M.A., Lenaerts, V., Dumoulin, Y., 1994. Cross-linked material for controlled release of biologically active compounds. *Canadian Patent* 2,041,774.
- Mulhbach, J., Ispas-Szabo, P., Lenaerts, V., Mateescu, M.A., 2001. Cross-linked high amylose starch derivatives as matrices for controlled release of high drug loadings. *J. Control. Release* 76, 51–58.
- Mulhbach, J., Ispas-Szabo, P., Mateescu, M.A., 2004. Cross-linked high amylose starch derivatives for drug release. II. Swelling properties and mechanistic study. *Int. J. Pharm.* 278, 231–238.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142–201.
- Pazur, J.H., 1965. Enzymes in synthesis and hydrolysis of starch. In: Whistler, R.L., Paschall, E.F. (Eds.), *Starch: Chemistry and Technology*, vol. 1. New York/London, Academic Press, pp. 133–175.
- Rajan, A., Prasad, V.S., Abraham, T.E., 2006. Enzymatic esterification of starch using recovered coconut oil. *Int. J. Biol. Macromol.* 39, 265–272.
- Schell, H.D., Serban, M., Mateescu, M.A., Bentia, T., 1978. Acid and basic amylose ionic exchangers. *Revue Roumaine Chim.* 23, 1143–1147.
- Snoeck, V., Huyghebaert, N., Cox, E., Vermeire, A., Vancaeneghem, S., Remon, J.P., Goddeeris, B.M., 2003. Enteric-coated pellets of F4 *fimbriae* for oral vaccination of suckling piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 96, 219–227.
- Snoeck, V., Cox, E., Verdonck, F., Joensuu, J.J., Goddeeris, B.M., 2004. Influence of porcine intestinal pH and gastric digestion on antigenicity of F4 *fimbriae* for oral immunisation. *Vet. Microbiol.* 98, 45–53.
- Sunthongjeen, S., Puttipipatkachorn, S., Paeratakul, O., Dashevsky, A., Bodmeier, R., 2004. Development of pulsatile release tablets with swelling and rupturable layers. *J. Control. Release* 95, 147–159.
- Svensson, E., Eliasson, A.C., 1995. Crystalline changes in native wheat and potato starches at intermediate water levels during gelatinization. *Carbohydr. Polym.* 26, 171–176.
- US Pharmacopeia XXII, 1990. US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, pp. 1788–1789.
- Van den Broeck, W., Cox, E., Goddeeris, B.M., 1999a. Receptor-dependent immune responses in pigs after oral immunization with F4 *fimbriae*. *Infect. Immun.* 67, 520–526.
- Van den Broeck, W., Cox, E., Goddeeris, B.M., 1999b. Induction of immune responses in pigs following oral administration of purified F4 *fimbriae*. *Vaccine* 17, 2020–2029.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejpb

Research paper

Carboxymethyl high amylose starch: Chitosan self-stabilized matrix for probiotic colon delivery

Carmen Calinescu, Mircea Alexandru Mateescu*

Department of Chemistry and Centre BioMed, Université du Québec à Montréal, Montréal, Que., Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 April 2008

Accepted in revised form 5 June 2008

Available online 18 June 2008

Keywords:

Carboxymethyl high amylose starch

Chitosan

Tablet

Lactobacillus rhamnosus probiotic

Colon delivery

ABSTRACT

A new hydrophilic tablet dosage system based on an ionic self-stabilization of a carboxylated (carboxymethyl high amylose starch, CM-HAS) and an amino (Chitosan) excipient was proposed for probiotic colon delivery. CM-HAS (protonated and compacted in acidic medium) ensures gastro-protection and Chitosan (low soluble in intestinal media) prevents early release of *Lactobacillus rhamnosus* bacteria. Thus, in CM-HAS:Chitosan monolithic tablets, increasing percentage and molecular weight (MW) of Chitosan generated a decrease of bacteria release rate, bacteria being the most effectively retarded by the highest MW of Chitosan (2.2×10^6 g/mol). The monolithic formulations containing high percentages of CM-HAS (80%) delivered bacteria after 2 h of incubation in gastrointestinal conditions for all the Chitosan MWs used. A combined mechanism of bacteria release is proposed for CM-HAS:Chitosan monolithic tablets, involving the swelling of the tablets (due to the Chitosan), followed by the erosion and dissolution of CM-HAS. In addition, a gel-forming barrier of Chitosan in acidic conditions also contributed to the delay of the bacteria delivery. The CM-HAS dry-coated monolithic tablets changed the effect of Chitosan molecular weight on bacteria liberation and improved the percentage of delivered bacteria in simulated intestinal conditions.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The interest of probiotics as remedies for a broad number of gastrointestinal diseases is continuously growing. Probiotics are live microorganisms administered as food supplements in order to improve the host intestinal microbial balance and to confer major health benefits such as modulation of the immune system [1,2], enhanced healing of damaged gastrointestinal mucosa [3], relapsing of *Clostridium difficile* diarrhea [4] and antagonism against pathogens (i.e. *Lactobacilli* able to compete with, exclude and displace pathogenic gastrointestinal bacteria when incubated together [5]). Widespread prescription of antibiotics is often associated with the disruption of the protective flora and can lead to predisposition to infections. The control of infections without using antibiotics is a large advantage and probiotic therapy represents a promising alternative. Among probiotic bacteria, *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* strains are largely present in humans. It has been shown that fecal levels of these strains were reduced in patients with inflammatory bowel disease (IBD), such as Crohn's disease and ulcerative colitis [6,7], suggesting an alteration of the colonic flora as one of the factors responsible for these diseases.

Lactic acid bacteria impart further nutritional and therapeutic benefits such as: improved digestion of lactose [8], control of some types of cancer [9] and control of cholesterol levels [10]. To be effective, orally administered probiotics should be efficiently implanted in the intestine and adhesion to the intestinal mucosa is considered one of the beneficial health effects of probiotics. This requires that the cells survive during the preparation of dosage forms and passage through the acidic environment. Reaching the intestine, these microorganisms should be able to establish themselves, remain viable and perform their beneficial actions. In this context, oral formulations have to protect the bioactive agent from the gastric acidity and to deliver it to the intestinal site. Colon target is the main objective of drug formulation for the prevention and the topical treatment of IBD or other infectious disorders and for the therapy of colorectal cancer. Oral formulations for the colonic delivery should afford gastric protection of bioactive agents in the stomach and delay their release through the small intestine in order to allow their complete release in the colon.

We have recently proposed CM-HAS as an excipient for bioactive agent transport in simulated gastrointestinal conditions [11,12]. Thus, in gastric acidity, CM-HAS (Na^+) changes the cation for a proton, resulting in a compact structure of the tablet and conferring gastro-stability of the active agent against acidic and enzymatic denaturation. In intestinal fluid, the protonated form of CM-HAS (H^+) will change the proton for cations, enhancing the water uptake and generating the polymeric swelling and matrix

* Corresponding author. Department of Chemistry and Centre BioMed, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. A, Montréal, Que., Canada H3C 3P8. Tel.: +1 514 987 4319; fax: +1 514 987 4054.

E-mail address: mateescu.m-alexandru@uqam.ca (M.A. Mateescu).

dissolution and the release of the bioactive agents. Thus, due to its relatively fast and total dissolution, which can be enhanced by enzymatic hydrolysis of α -amylase, CM-HAS alone may not be suitable in formulations of drugs aimed at colon delivery. Recently, we have proposed an association CM-HAS:Chitosan [13] in which both macromolecular excipients contribute to a physical and chemical stabilization of the matrix to formulate small molecules for intestinal delivery. We are now reporting a hydrophilic matrix based on binary mixtures of CM-HAS:Chitosan for colon delivery of lactic acid bacteria. It is well known that Chitosan, a linear polysaccharide consisting of β -(1-4)-linked 2-amino-2-deoxy-D-glucose still presenting a certain number of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose units, is a good matrix for the delayed liberation of active agents in colon. Chitosan can be obtained by the partial alkaline [14] or enzymatic [15] N-deacetylation of naturally occurring chitin. An important advantage of Chitosan for its successful use in colon-targeting consists in its stability against the enzymes in duodenum and the lower intestinal tract, but susceptible to a certain degradation by colonic bacterial enzymes [16]. However, an important limitation can be its dissolution in the gastric medium due to the protonation of amino groups. To prevent this, the association of Chitosan with another excipient carrying carboxylic functions such as alginate [17] or xanthan [18] has been suggested. The association of CM-HAS with Chitosan in monolithic tablet formulations is expected to assure a good stability of the tablet and a good viability of bacteria in gastric conditions (due to the presence of CM-HAS) and, at the same time, to delay the bacteria liberation in intestinal media (due to the presence of Chitosan). To overcome certain aspects related to the high solubility of Chitosan in the simulated gastric media, we have also tested a novel double-layer system based on CM-HAS:Chitosan tablets coated with CM-HAS polymer.

The aim of this study was to investigate the effect of CM-HAS:Chitosan excipient association on the stability of monolithic and of CM-HAS dry-coated tablets and the effect of the Chitosan molecular weight on the delaying *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) probiotic delivery.

2. Materials and methods

2.1. Materials

High amylose starch (Hylon VII) was from National Starch (Bridgewater, NJ, USA). Chitosan 1 (98% degree of deacetylation, DDA) and Chitosan 2–4 (84% DDA) from crab shells were purchased from Sigma–Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA), where the numbers were ascribed to represent different molecular weights used in our formulations. Pepsin (porcine gastric mucosa) was from Sigma–Aldrich Chemical Company and pancreatin (porcine pancreas extract with α -amylase, lipase and proteolytic activities) from A&C American Chemicals Ltd. (Montreal, Que., Canada).

The *Lactobacillus rhamnosus* probiotic bacteria (HA-111 strain) were generously supplied by Harmonium International Inc. (Mirabel, Que., Canada). Difco[®] *Lactobacilli* MRS (DeMan, Rogosa and Sharpe) agar, for the culture media, was from Fisher Scientific Company (Ottawa, Ont., Canada).

The other chemicals were of reagent grade and used without further purification.

2.2. Synthesis of polymeric derivative CM-HAS

The starch derivative was synthesized as previously described [12]. The CM-HAS powder, held overnight to air at room temperature, was ground in a blender, and then sieved to obtain a powder

(particles granulometry between 75 and 300 μ m), used to prepare the tablets.

The CM-HAS structure was analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and the degree of substitution (DS) was determined by nuclear magnetic resonance (¹H NMR) – 300 MHz (Varian Gemini) in deuterated dimethyl-d₆ sulfoxide (99.9 atom%D, CDN Isotopes, Que., Canada) as previously described [12].

2.3. Chitosan preparation

All the purchased Chitosans were dissolved in 2% acetic acid solution and every viscous solution was passed through a filter paper to remove the undissolved residues. A solution of 1.0 M NaOH was added to the homogeneous filtrate until a pH of 6.5 and then, Chitosan was precipitated with acetone. The precipitated polymer was thoroughly washed with distilled water, dried with 100% acetone and then dried at room temperature. The powders were sieved retaining fractions smaller than 300 μ m for tablet formulations.

2.4. Molecular weight determination of Chitosan polymers

The molecular weight (MW) of the Chitosan samples was determined viscometrically, using a Cannon–Ubbelohde semi-micro viscometer (State College, PA, USA) for increasing Chitosan concentrations (0.01–0.15%) in 0.3 M acetic acid/0.2 M sodium acetate buffer at 25 \pm 0.05 for Chitosan MW1 [19] or in 0.2 M acetic acid/0.1 M sodium acetate buffer at 30 \pm 0.05 for Chitosan MW2–4 [20]. The flow time data were used to calculate the intrinsic viscosity ($[\eta]$), as the intercept of the linear regression of reduced viscosity versus concentration extrapolated to zero concentration [20]. The average MW (MW_v) for each Chitosan type was determined from the intrinsic viscosity, using the Mark–Houwink–Sakurada Eq. (1) and the parameters *K* and α , obtained following Rinaudo et al. [19] and Wang et al. [20].

$$[\eta] = K \times MW_v^\alpha \quad (1)$$

2.5. Monolithic and CM-HAS dry-coated tablet formulation

2.5.1. Preparation of monolithic tablets

Monolithic tablets (200 mg) based on CM-HAS:Chitosan excipients (different ratios) were obtained by direct compression of a homogenous mixture of dry powders containing 190 mg of CM-HAS and Chitosan excipient polymers and 10 mg of probiotic *L. rhamnosus* bacteria (representing 10⁹ colony-forming units, CFU). The mixture was compressed at 2.5 T/cm² using a manual hydraulic Carver press (Wabash, IN, USA) and 9.0 mm cylinder outfits with flat-faced punches.

2.5.2. Preparation of CM-HAS dry-coated tablets

Monolithic tablets (200 mg) based on CM-HAS:Chitosan and containing 10 mg of bacteria were formulated as previously described. Then, they were double-faced coated with 300 mg CM-HAS polymer only: 130 mg CM-HAS on the inferior side and 170 mg CM-HAS on the lateral and upper sides of the monolithic tablet in the die. The compression was done at 2.5 T/cm², using 13.0 mm cylinder outfits with flat-faced punches (obtaining dry-coated tablets of 500 mg).

2.6. Bacteria delivery in the simulated gastric and intestinal media

Monolithic (200 mg) and CM-HAS dry-coated (500 mg) tablets were incubated for 1 h in 50 mL of sterile simulated gastric fluid (SGF, pH 1.2) [21] and then transferred into 50 mL of sterile simu-

lated intestinal fluid (SIF, pH 6.8) [21] and incubated for 24 h at 37 °C and 50 rpm, using an incubator shaker (Series 25 D, New Brunswick Scientific Co., NJ, USA). Samples of 100 μ L were taken after 1 h in SGF and at every hour in the SIF over the first 12 h and after 24 h of SIF to evaluate the viability of the liberated bacteria from the tablets. After 1 h in SGF and 24 h in SIF, the tablets were crushed in the SIF medium to determine the number of bacteria that still remained inside the tablet.

The number of CFU was counted on the aliquots removed and serially diluted in 0.1% sterile bacteriological peptone water and then cultured on MRS nutrient agar plates at 37 °C for 48 h, to calculate the number of living bacteria liberated in function of time.

The initial number of bacterial CFU in 10 mg of lyophilized bacteria was determined in sterile phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) at room temperature. As control, 10 mg of free bacteria was incubated in the same conditions as in the case of formulated bacteria: 1 h in 50 mL sterile SGF medium and, respectively, 24 h in 50 mL sterile SIF at 37 °C and 50 rpm. All the colonies were counted after aerobic incubation at 37 °C for 48 h.

2.7. Water uptake and erosion studies

Tablets based on 100% Chitosan (MW1–4), on 50% CM-HAS:50% Chitosan (MW1–4) and on 100% CM-HAS, each containing 10 mg of lyophilized *L. rhamnosus*, were kept in the same conditions as for the dissolution tests (at 50 rpm and 37 °C). For the water uptake

study, the hydrated tablets of 100% Chitosan (MW1–4) and of 50% CM-HAS:50% Chitosan (MW1–4) were removed from the dissolution medium after 1 h SGF and after every 2 h in SIF (during an overall duration of 12 h in SIF), blotted with tissue paper to eliminate the excess surface water and then weighed. The remaining dry weight of tablets was determined in an oven at 50 °C after 1 h in SGF and after 2, 12 and 24 h of SIF incubation for matrices based on 100% Chitosan (MW1–4) and on 50% CM-HAS:50% Chitosan (MW1–4). Concerning the 100% CM-HAS matrix, the tests were performed after 1 h in SGF and after 2, 3 and 4 h only of SIF incubation due to rapid tablet dissolution. The percentage of water uptake and that of erosion were determined gravimetrically as previously described [12].

2.8. Scanning electron microscopy

2.8.1. Sample preparation

Monolithic and CM-HAS dry-coated tablets based on 100% Chitosan (MW1–4), on 50% CM-HAS:50% Chitosan (MW1–4) and on 100% CM-HAS, prepared as previously described (Section 2.5), were incubated for 1 h in SGF and then transferred for 6 h in SIF (50 rpm, 37 °C). Due to their faster dissolution in simulated intestinal media, the 100% CM-HAS monolithic tablets were incubated for 1 h in SGF and only 2 h in SIF (50 rpm, 37 °C). Then, the tablets were frozen and lyophilized for a week. The dry tablets were mounted on metal supports and their surface and intern (section)

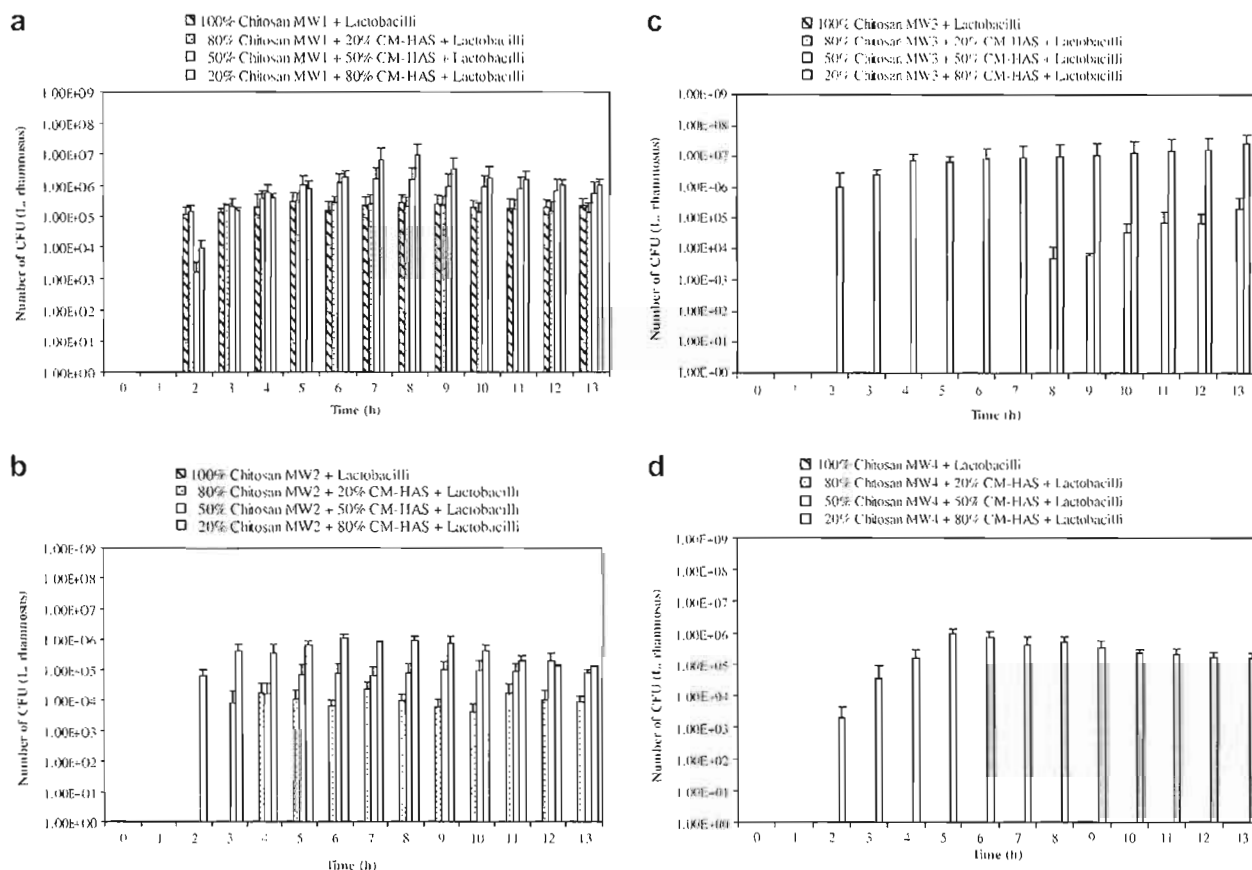


Fig. 1. Liberation of living *Lactobacillus rhamnosus* formulated in CM-HAS:Chitosan (MW1–4) monolithic tablets following incubation in gastric and intestinal medium. The tablets were incubated for 1 h in simulated gastric fluid and then transferred into simulated intestinal fluid for 12 h at 37 °C and 50 rpm. CM-HAS:Chitosan formulations based on (a) Chitosan MW1: 1.2×10^5 g/mol, (b) Chitosan MW2: 6.3×10^5 g/mol, (c) Chitosan MW3: 9×10^5 g/mol and (d) Chitosan MW4: 2.2×10^6 g/mol ($n = 3$). The bacterial number at the undetectable level was considered to be zero. CFU, colony-forming units.

Table 1

Modulation of bacteria liberation from CM-HAS:Chitosan formulations by different molecular weights of Chitosan

| Tablets | Monolithic (h) | | | | CM-HAS dry-coated (h) | | | |
|---------|----------------|-----|-----|-----|-----------------------|-----|-----|-----|
| | 100% | 80% | 50% | 20% | 100% | 80% | 50% | 20% |
| MW1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 5 | 4 | 4 | 4 |
| MW2 | – | 4 | 3 | 2 | 3 | 3 | 5 | 5 |
| MW3 | – | – | 8 | 2 | 4 | 3 | 3 | 5 |
| MW4 | – | – | – | 2 | 2 | 3 | 3 | 4 |

Tablets based on different ratios of CM-HAS:Chitosan (where the degree of substitution of CM-HAS was 0.25 and Chitosan was of different MW1–4) have been incubated for 1 h in simulated gastric fluid (SGF, pH 1.2) and 12 h in simulated intestinal fluid (SIF, pH 6.8), at 37 °C and 50 rpm. (–) means no detectable level of liberated bacteria after 1 h in SGF and 12 h in SIF. Chitosan MW1: 1.2×10^5 g/mol, Chitosan MW2: 6.3×10^5 g/mol, Chitosan MW3: 9×10^5 g/mol and Chitosan MW4: 2.2×10^6 g/mol.

morphology were examined by an Hitachi S-4300SE/N variable pressure-scanning electron microscope (Hitachi High Technologies America, Pleasanton, CA, USA), using an environmental-scanning electron detector.

3. Results and discussion

The initial count of *L. rhamnosus* free cells dropped from 10^9 CFU to an undetectable level after exposure to a pH 1.2 (SGF) for 1 h, as expected, since *L. rhamnosus* is known to be sensitive in an acidic environment. When incubated in SIF (pH 6.8) for 24 h, the free bacteria population was maintained (data not shown).

Chitosan is a polycationic polymer in acidic environments and the basic nature of Chitosan depends on its degree of deacetylation. Before solubilization, Chitosan rapidly forms gels in acidic environments and this makes Chitosan interesting in relation to the development of slow-release dosage forms for oral administration. The MW of Chitosan excipients was determined by viscosimetry for Chitosan 1 (MW1: 1.2×10^5 g/mol), Chitosan 2 (MW2: 6.3×10^5 g/mol), Chitosan 3 (MW3: 9×10^5 g/mol) and Chitosan 4 (MW4: 2.2×10^6 g/mol).

The substitution of high amylose starch polymer was confirmed by FTIR (data not shown) and its degree of substitution (DS 0.25) was determined by NMR spectroscopy of a CM-HAS hydrolytically depolymerized sample.

The monolithic tablet formulations based on high percentages of Chitosan MW1 presented a capping phenomenon after 1 h in

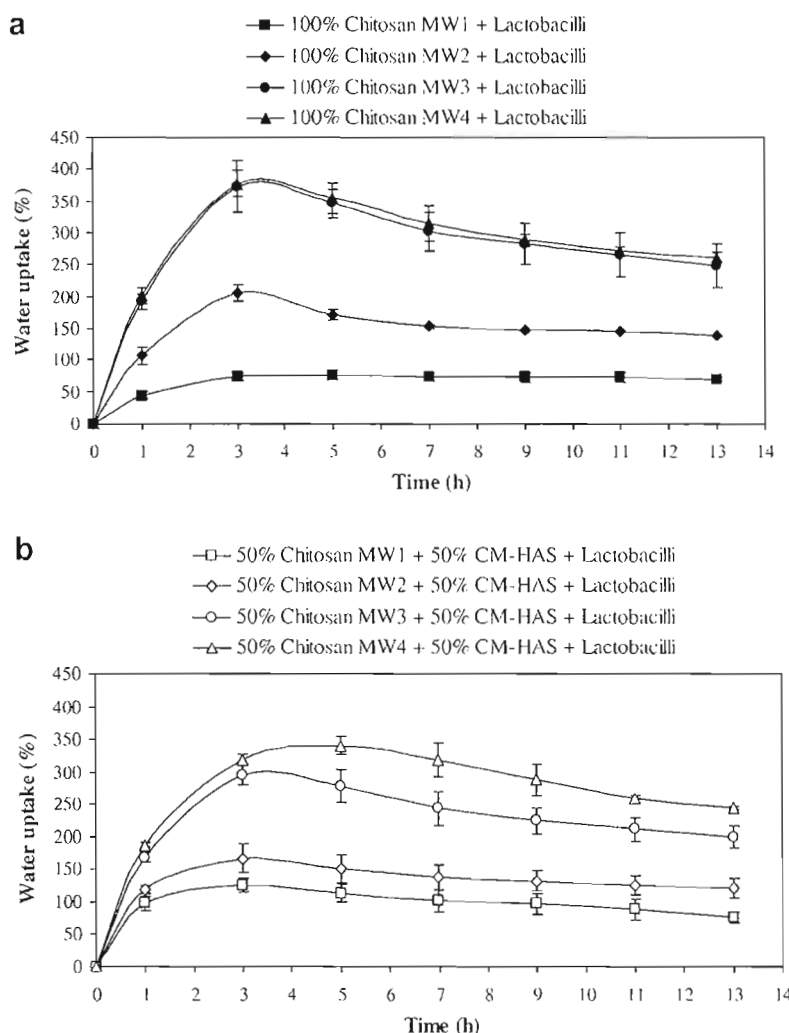


Fig. 2. Water uptake of monolithic matrices based on CM-HAS:Chitosan (MW1–4). The tablets were incubated for 1 h in simulated gastric fluid and 12 h in simulated intestinal fluid, at 37 °C and 50 rpm. (a) 100% Chitosan MW1–4 monolithic tablets and (b) 50% CM-HAS:50% Chitosan (MW1–4) monolithic tablets ($n = 3$). Chitosan MW1: 1.2×10^5 g/mol, Chitosan MW2: 6.3×10^5 g/mol and Chitosan MW3: 9×10^5 g/mol, Chitosan MW4: 2.2×10^6 g/mol.

SGF and 1 h in SIF (100% Chitosan) and, respectively, after 2 h in SIF (80% Chitosan:20% CM-HAS), and the bacteria were rapidly liberated (Fig. 1a). An increase in CM-HAS percentage afforded a good stabilization of the CM-HAS:Chitosan MW1 monolithic tablet in intestinal medium. Thus, formulations based on 50% CM-HAS:50% Chitosan MW1 and on 80% CM-HAS:20% Chitosan MW1 preserved the shape of the tablet after 1 h in SGF and 12 h in SIF at 37 °C and 50 rpm, without any capping. This stabilization could be partially due to an *in situ* interaction between the carboxylic function of CM-HAS and amino groups of Chitosan which could appear at the external layer and, in a certain extension, within the tablets, particularly with the advancement of the aqueous front.

From monolithic tablets based on 100% Chitosan MW2–4, there was no detectable level of bacteria liberation during 12 h of incubation in SIF, at 37 °C and 50 rpm (Fig. 1b–d). However, after 24 h of SIF incubation, low levels of released bacteria were found in the case of 100% Chitosan MW2–3 formulations and, at crushing of these tablets, a considerable amount of viable bacteria retained inside the tablets was found. The situation was different for the monolithic tablets based on 100% Chitosan MW4, which did not liberate the bacteria at all after 12/24 h of SIF incubation, but a marked amount of living *L. rhamnosus* was still found inside the tablet (data not shown).

The Chitosan in solution is known to present some antibacterial activity [22]. As the pK_a of Chitosan is about 6.5, below this pH the amino groups are positively charged and can interact with anionic groups of the microbial cell surface. Thus, Chitosan may bind and weaken the barrier function of the outer membrane of bacteria, altering the membrane permeability and producing metabolic disturbance and eventual death of bacteria [23]. In the case of bacteria formulated in monolithic tablet form, the gastric acidity in contact with the Chitosan is limited only to surface surroundings of the monolithic tablets. Furthermore, due to the protection afforded by the protonated carboxylic groups of CM-HAS [11] and because of possible hydrogen-bonding between the amino groups of Chitosan and hydroxyl and carboxyl groups of CM-HAS and, at the same time, of possible ionic stabilization between the amino groups of Chitosan and carboxylic functions of CM-HAS, its antibacterial effect seems greatly reduced. Increasing the ratio of the CM-HAS in the matrix, a larger number of CM-HAS macromolecules came in contact with SIF dissolution medium and, hence, the matrix erosion is enhanced and a higher amount of living bacteria is delivered (Fig. 1a–d). The increasing MW of Chitosan generates a delay in delivery times of the active principle [24]. Therefore, bioactive agent release *in vitro* can be controlled by adequate choice of the amount and of the MW of Chitosan in the tablet (Table 1, Fig. 1a–d), bacteria being the most effectively retarded by the highest MW of Chitosan. The monolithic formulations containing high percentages of CM-HAS (80%) delivered bacteria after 2 h for all the Chitosan MWs (Table 1).

The water uptake of CM-HAS:Chitosan monolithic tablets increased with the increase of Chitosan MW for both 100% Chitosan and 50% Chitosan:50% CM-HAS formulations (Fig. 2a and b). The Chitosan tablets presented a high water retention which could be advantageous for the development of slow-release formulations, because it might facilitate the formation of gels that would better control drug release.

The matrices based on 100% Chitosan (MW1–4), on 50% CM-HAS:50% Chitosan (MW1–4) and on 100% CM-HAS presented almost the same percentage of erosion after 1 h of SGF incubation (Fig. 3). At increased percentage of CM-HAS in CM-HAS:Chitosan monolithic formulations, the tablet erosion in SIF conditions was accelerated. Thus, tablets based on 100% Chitosan (MW1–4), with no CM-HAS at all, showed an erosion of only 16–27%, while those based on 50% CM-HAS:50% Chitosan (MW1–4) presented an erosion between 55% and 65% after 12/24 h of incubation in SIF

(Fig. 3). The 100% CM-HAS matrix (particles granulometry between 75 and 300 μ m) was rapidly eroded: 100% of matrix erosion was registered only after 1 h in SGF and 4 h in SIF (Fig. 3). A combined mechanism of bacteria release is proposed for CM-HAS:Chitosan monolithic tablets, involving the swelling of the tablets due to the Chitosan, followed by the erosion and dissolution of CM-HAS. In addition, a gel-forming barrier of Chitosan in acidic conditions also contributed to the delay of the bacteria delivery and depended on the amount (%) and on the MW of the Chitosan used in the formulation.

In the case of CM-HAS dry-coated tablets, the external double-layer of CM-HAS protected the CM-HAS:Chitosan tablet core against the acidity of SGF and, then, at a SIF pH of 6.8, it was deprotonated and eroded, affording a greater protection of bacteria. Since the gastric acidity did not enter into direct contact with Chitosan within the tablet, the amino groups of Chitosan may not be positively charged and thus, the antibacterial effect of Chitosan could be lowered. The CM-HAS dry-coating of monolithic tablets generated an unexpected change in the effect of Chitosan MW on bacterial liberation (Table 1), markedly improving the percentage of delivered bacteria in simulated intestinal conditions (Fig. 4a–d) in comparison with the monolithic formulations (Fig. 1a–d). The observed enhanced release of bacteria was attributable first to the erosion and dissolution of the CM-HAS external layer, favoring a substantial water uptake of Chitosan and, then, to the erosion and dissolution of the CM-HAS from the monolithic remaining core. Due to the presence of CM-HAS at the external sur-

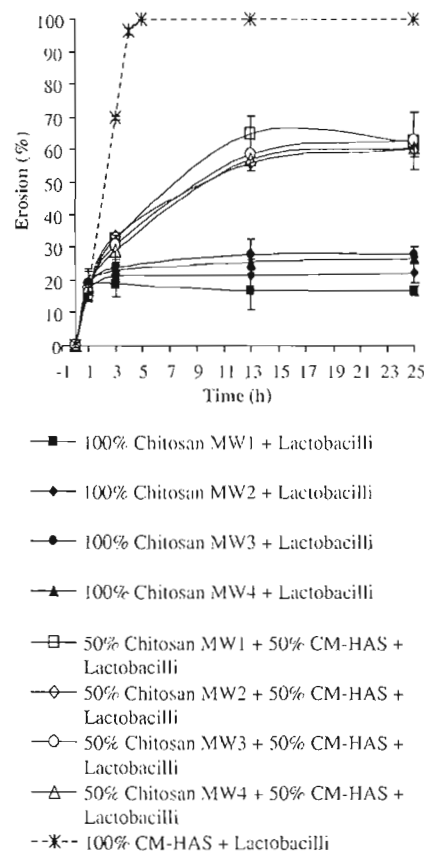


Fig. 3. Erosion studies of CM-HAS:Chitosan (MW1–4) monolithic tablets. The tablets were incubated for 1 h in simulated gastric fluid and 24 h in simulated intestinal fluid, at 50 rpm and 37 °C ($n=3$). Chitosan MW1: 1.2×10^5 g/mol, Chitosan MW2: 6.3×10^5 g/mol, Chitosan MW3: 9×10^5 g/mol and Chitosan MW4: 2.2×10^6 g/mol.

face of the tablet, the acidity did not enter until the core of the tablet and no Chitosan gel can be formed in SGF. Thus, in the absence of the Chitosan gel-controlling barrier, the bacteria were rapidly liberated. Even the CM-HAS dry-coated formulations which contain 100% Chitosan core (MW2–4) liberated a large quantity of *L. rhamnosus* during the 12 h of SIF incubation (Fig. 4a–d).

In the case of CM-HAS:Chitosan (MW2–4) monolithic formulations (84% DDA), with the increasing MW of Chitosan, the bacteria release was delayed. This effect was not present in CM-HAS dry-coated formulations. Concerning the effect of the DDA on bacteria liberation, no conclusion could be reached from this study because the Chitosans used had different MWs (Chitosan MW1: 98% DDA and Chitosan MW2–4: 84% DDA). Since only the free (non-acetylated) amino groups bind protons, the charge density of the Chitosan depends on the ratio of the two monomers in a chain. It is known that for the same Chitosan MW, at increasing DDA, the viscosity of Chitosan increases because the polyelectrolytic characteristics of Chitosan become more marked. Thus, at a high DDA (98% for Chitosan MW1), Chitosan is highly charged in acidic solution and less charged for smaller DDA (as 84% for Chitosan MW2–4). Sakkinen et al. (2002) found that the drug release rate was controlled in a lesser extent by the DDA of high MW of Chitosan [25]. In contrast, Sabnis et al. (1997) reported that the changing the DDA of Chitosan could control the drug release [26] and that higher DDA results in increasing formation of a rate-limiting Chitosan gel-barrier and in decreasing drug release rates from tablets (pH 1.2). However, the Chitosan of low MW used in the later case may explain the different findings from the two studies.

The surface morphology of CM-HAS and/or Chitosan tablets was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) for monolithic and CM-HAS dry-coated tablets. Generally, the surface of the 100% Chitosan monolithic tablets was dense (Fig. 5a). The external surface of 50% CM-HAS:50% Chitosan monolithic matrices showed large voids within a dense matrix (Fig. 5b), similar results being obtained for Chitosan MW2–4. For the matrix based on 50% CM-HAS:50% Chitosan MW1, the surface structure was different (Fig. 5c). The 100% CM-HAS matrix had a porous structure (Fig. 5d), drastically differing from that of 100% Chitosan matrix (Fig. 5a).

After 1 h in SGF and 6 h in SIF, there were some morphology differences between the monolithic and the CM-HAS dry-coated formulations based on 100% Chitosan and on 50% CM-HAS:50% Chitosan, with the loss of dense surface for the formulations coated with CM-HAS (Fig. 5a'–b'), similar results being observed for MW2–4 of Chitosan. This aspect confirmed the fact that, in the presence of CM-HAS external layer, the Chitosan within the tablet did not enter into direct contact with the gastric acidity and, thus, did not form the dense, gel-barrier that controls the bacteria liberation in SIF medium. Concerning the internal structure of CM-HAS dry-coated 50% CM-HAS:50% Chitosan formulations, there were no morphology differences between the tablets made with the four MWs of Chitosan (data not shown).

In vivo, Chitosan is known to be degraded by enzymes produced by bacteria present in the colon. Zhang and Neau [27] reported that both MW and DDA affect the Chitosan degradation by colonic enzymes. Lower MW and DDA of Chitosan favored a faster degrada-

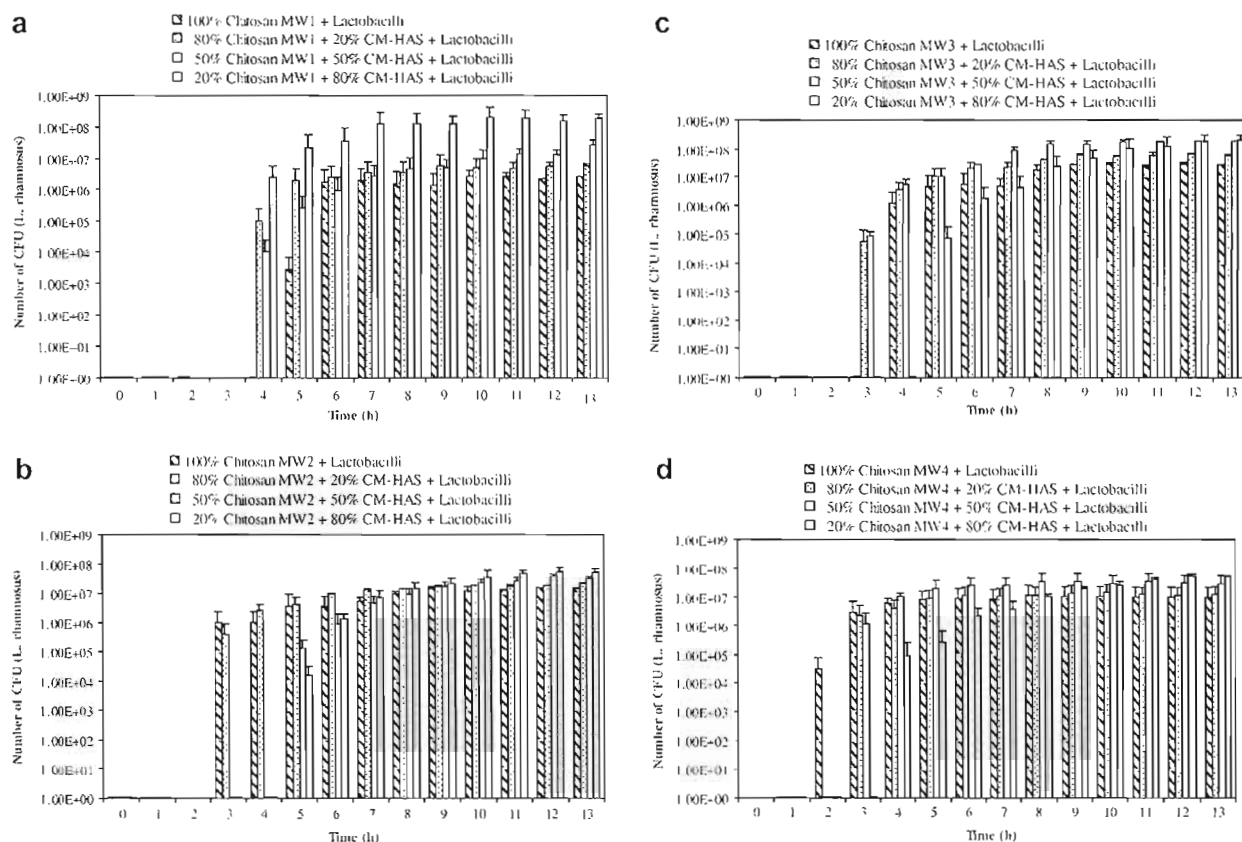


Fig. 4. Liberation of living *Lactobacillus rhamnosus* formulated in CM-HAS dry-coated tablets containing CM-HAS:Chitosan (MW1–4) core following incubation in gastric and intestinal medium. The tablets were incubated for 1 h in simulated gastric fluid and then transferred into simulated intestinal fluid for 12 h, at 37 °C and 50 rpm. CM-HAS:Chitosan formulations based on (a) Chitosan MW1: 1.2×10^5 g/mol, (b) Chitosan MW2: 6.3×10^5 g/mol, (c) Chitosan MW3: 9×10^5 g/mol and (d) Chitosan MW4: 2.2×10^6 g/mol ($n = 3$). The bacterial number at the undetectable level was considered to be zero. CFU, colony-forming units.

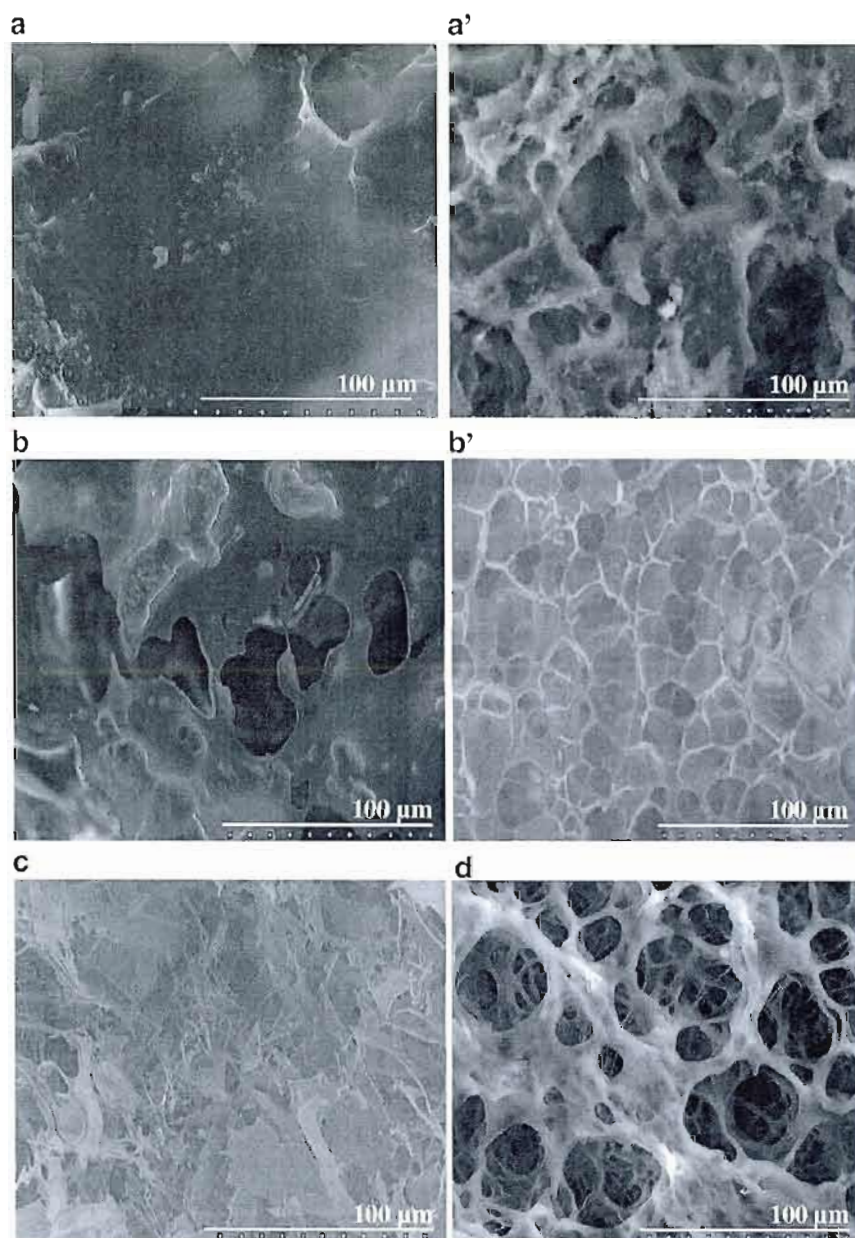


Fig. 5. Scanning electron microscopy images from surface structures of CM-HAS:Chitosan matrices (a) 100% Chitosan MW4 monolithic and (a') dry-coated tablet. (b) 50% CM-HAS:50% Chitosan MW4 monolithic and (b') dry-coated tablet. (c) 50% CM-HAS:50% Chitosan MW1 monolithic tablet. (d) 100% CM-HAS monolithic tablet. Only with the exception of 100% CM-HAS monolithic tablet (which was kept for 1 h in simulated gastric fluid/SGF and 2 h in simulated intestinal fluid/SIF), all the other tablets were kept for 1 h in SGF and 6 h in SIF, at 37 °C and 50 rpm. The tablets were frozen and lyophilized for a week and then, they were analyzed by scanning electron microscopy ($n = 3$). Chitosan MW1: 1.2×10^5 g/mol and Chitosan MW4: 2.2×10^6 g/mol.

tion rate. It was also reported that the pH may decrease in the colon as compared with the pH of the small intestine [28] due to the acidification of the colonic contents by the products of bacterial fermentation. This lower pH could contribute to enhanced Chitosan degradation and to a better colonic liberation of bioactive agent.

The novelty of our formulation is the ionic self-stabilization of the two carboxylated (CM-HAS) and amino (Chitosan) polymers which ensure a two-step pH sensitive protection of bioactive agents. Thus, CM-HAS (protonated and compacted in acidic medium) ensures gastro-protection and it is susceptible to α -amylase attack, modulating the bacteria release, whereas Chitosan hydrogel (deprotonated in intestinal fluid) ensures stabiliza-

tion against pancreatic enzymes. Furthermore, Chitosan, low soluble in neutral media, prevents early release of bacteria, which can be thus delivered to the colon. The advantage of the use of CM-HAS versus other carboxylic matrices (i.e. alginate, xanthan) associated with Chitosan is that our CM-HAS, with less carboxyl equivalents/monomer, is supposed to be less adhesive in the early gastrointestinal segments, enhancing thus the colon delivery.

In conclusion, CM-HAS association with Chitosan (monolithic tablets) can modulate the Chitosan excipient properties as probiotic agent carrier, increasing the number of liberated living bacteria, with the bacteria release modulated by the molecular weight of Chitosan. Concerning the dry-coated tablets, the CM-HAS external

layer afforded a better protection of bacteria, with an enhanced number of CFU of *L. rhamnosus* delivered in simulated intestinal conditions. In this context, the CM-HAS could be an efficient excipient for dry-coated formulations for colon delivery.

Acknowledgements

The Canada graduate studentship from NSERC granted to Carmen Calinescu is gratefully acknowledged. Thanks are due to Dr. Francine Mondou (Harmonium International Inc., Canada) for generous supply of the *Lactobacillus rhamnosus* and to Dr. Alain Richard (Gestion Valeo Inc.) for the interest in this project.

References

- [1] E.J. Schiffrin, D. Brassart, A.L. Servin, F. Rochat, A. Donnet-Hughes, Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection, *Am. J. Clin. Nutr.* 66 (1997) 515S–520S.
- [2] M.D. Parra, B.E. Martinez de Morentin, J.M. Cobo, A. Mateos, J.A. Martinez, Daily ingestion of fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN114001 improves innate-defense capacity in healthy middle-aged people, *J. Physiol. Biochem.* 60 (2004) 85–91.
- [3] S.N. Elliot, A. Buret, W. McKnight, M.J. Miller, J.L. Wallace, Bacteria rapidly colonize and modulate healing of gastric ulcers in rats, *Am. J. Physiol.* 275 (1998) G425–G432.
- [4] R.G. Bennet, S.L. Gorbach, B.R. Goldin, Treatment of relapsing *Clostridium difficile* diarrhea with *Lactobacillus* GG, *Nutrition Today* 31 (1996) 355–385.
- [5] Y.K. Lee, K.Y. Puong, A.C. Ouwehand, S. Salminen, Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by *Lactobacilli*, *J. Med. Microbiol.* 52 (2003) 925–930.
- [6] M.G. Hartley, M.J. Hudson, E.T. Swarbrick, M.J. Hill, A.E. Gent, M.D. Hellier, R.H. Grace, The rectal mucosa-associated microflora in patients with ulcerative colitis, *J. Med. Microbiol.* 36 (1992) 96–103.
- [7] C. Favier, C. Neut, C. Mizon, A. Cortot, J.F. Colombel, J. Mizon, Fecal beta-D-galactosidase production and *Bifidobacteria* are decreased in Crohn's disease, *Dig. Dis. Sci.* 42 (1997) 817–822.
- [8] H. Hove, H. Norgaard, P.B. Mortensen, Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract, *Eur. J. Clin. Nutr.* 53 (1999) 339–350.
- [9] Y. Aso, H. Akaza, T. Kotake, T. Tsukamoto, K. Imai, S. Naito, Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial, *Eur. Urol.* 27 (1995) 104–109.
- [10] J.W. Anderson, S.E. Gilliland, Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans, *J. Am. Coll. Nutr.* 18 (1999) 43–50.
- [11] C. Calinescu, J. Mulhbach, E. Nadeau, J.M. Fairbrother, M.A. Mateescu, Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipient for *Escherichia coli* oral formulations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60 (2005) 53–60.
- [12] C. Calinescu, E. Nadeau, J. Mulhbach, J.M. Fairbrother, M.A. Mateescu, Carboxymethyl high amylose starch for F4 fimbriae gastro-resistant oral formulation, *Int. J. Pharm.* 343 (2007) 18–25.
- [13] M. Leonida, M.A. Mateescu, Drug release profiles from Chitosan – carboxymethyl-starch matrices stabilized by ionic interactions. Transactions of the 33rd Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, 2006, #827.
- [14] K.L.B. Chang, G. Tsai, J. Lee, W.R. Fu, Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution, *Carbohydr. Res.* 303 (1997) 327–332.
- [15] Y. Araki, E. Ito, Chitin deacetylase, *Methods Enzymol.* 161 (1988) 510–514.
- [16] H. Iozaki, J. Komoike, C. Tada, T. Maruyama, A. Terabe, T. Suzuki, A. Yamamoto, S. Muranishi, Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: improvement of insulin absorption from the rat colon, *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 1016–1021.
- [17] S. Miyazaki, A. Nakayama, M. Oda, M. Takada, D. Attwood, Drug release from oral mucosal adhesive tablets of chitosan and sodium alginate, *Int. J. Pharm.* 118 (1995) 257–263.
- [18] F. Chellar, M. Tabrizian, S. Dumitriu, E. Chornet, P. Magny, C.H. Rivard, L. Yahia, *In vitro* and *in vivo* biocompatibility of chitosan–xanthan polyionic complex, *J. Biomed. Mater. Res.* 51 (2000) 107–116.
- [19] M. Rinaudo, M. Milas, P.L. Dung, Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion, *Int. J. Biol. Macromol.* 15 (1993) 281–285.
- [20] W. Wang, S. Bo, S. Li, W. Qin, Determination of the Mark–Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation, *Int. J. Biol. Macromol.* 13 (1991) 281–285.
- [21] U. S. Pharmacopeia National Formulary U.S.P. XXIV, NF XIX, United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD, 2000.
- [22] H.K. No, N.Y. Park, S.H. Lee, S.P. Meyers, Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights, *Int. J. Food Microbiol.* 74 (2002) 65–72.
- [23] D.H. Young, H. Kohle, H. Kauss, Effect of chitosan on membrane permeability of suspension-cultured glycine max and *Phaseolus vulgaris* cells, *Plant Physiol.* 70 (1982) 1449–1454.
- [24] J. Kristl, J. Smid-Korbar, E. Struc, M. Schara, H. Rupprecht, Hydrocolloids and gels of chitosan as drug carriers, *Int. J. Pharm.* 99 (1993) 13–19.
- [25] M. Sakkinen, U. Seppala, P. Heinanen, M. Marvola, *In vitro* evaluation of microcrystalline chitosan (MCCh) as gel-forming excipient in matrix granules, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 54 (2002) 33–40.
- [26] S. Sabnis, P. Rege, L.H. Block, Use of chitosan in compressed tablets of diclofenac sodium: inhibition of drug release in an acidic environment, *Pharm. Dev. Technol.* 2 (1997) 243–255.
- [27] H. Zhang, S.H. Neau, *In vitro* degradation of chitosan by bacterial enzymes from rat cecal and colonic contents, *Biomaterials* 23 (2002) 2761–2766.
- [28] G. Pye, D.F. Evans, S. Ledingham, J.D. Hardcastle, Gastrointestinal intraluminal pH in normal subjects and those with colorectal adenoma or carcinoma, *Gut* 31 (1990) 1355–1357.

Zymographic assay of plant diamine oxidase on entrapped peroxidase polyacrylamide gel electrophoresis. A study of stability to proteolysis

Carmen Calinescu · Rodolfo Federico ·
Bruno Mondovi · Mircea Alexandru Mateescu

Received: 4 August 2009 / Revised: 6 November 2009 / Accepted: 8 November 2009 / Published online: 29 November 2009
© The Author(s) 2009. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract A zymographic assay of diamine oxidase (DAO, histaminase, EC 1.4.3.6), based on a coupled peroxidase reaction, and its behavior at proteolysis in simulated gastric and intestinal conditions, are described. The DAO activity from a vegetal extract of *Lathyrus sativus* seedlings was directly determined on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide electrophoretic gels containing entrapped horseradish peroxidase, with putrescine as substrate of histaminase and *ortho*-phenylenediamine as co-substrate of peroxidase. The accumulation of azo-aniline, as peroxidase-catalyzed oxidation product, led to well-defined yellow-brown bands on gels, with intensities corresponding to the enzymatic activity of DAO. After image analysis of gels, a linear dependency of DAO content (Coomassie-stained protein bands) and of its enzymatic activity (zymographic bands) with the concentration of the vegetal extract was obtained. In simulated gastric conditions (pH 1.2, 37 °C), the DAO from the vegetal extract lost its enzymatic activity before 15 min of incubation, either in the presence or absence of pepsin. The protein pattern (Coomassie-stained) revealed that the DAO content from the vegetal extract was kept

almost constant in the simulated intestinal fluid (containing pancreatin or not), with a slight diminution in the presence of pancreatic proteases. After 10 h of incubation at 37 °C, the DAO enzymatic activity from the vegetal extract was 44.7% in media without pancreatin and 13.6% in the presence of pancreatin, whereas the purified DAO retained only 4.65% of its initial enzymatic activity in the presence of pancreatin.

Keywords Diamine oxidase · Zymographic assay · Entrapped peroxidase polyacrylamide gel · Proteolytic stability · Simulated gastro-intestinal conditions

Introduction

Plant diamine oxidases (DAOs), also referred as histaminases [1], are homodimeric copper amine oxidases (EC 1.4.3.6), each subunit containing a single copper ion and 2,4,5-trihydroxyphenylalanine quinone/TPQ, a cofactor derived from the post-translational oxidation of a tyrosine residue [2]. They present a high specificity for primary diamines, able to oxidate biogenic amines to corresponding aldehyde, ammonia (NH₃), and hydrogen peroxide (H₂O₂). Current DAO assays in solution measure the amine oxidase activity by spectrophotometrical methods, monitoring directly the absorbance of formed aldehydes [3] or by subsequent condensation of different compounds [4]. Other methods are based on radiometric assays, with [1,4-¹⁴C] putrescine as substrate [5], on oxymetric or polarographic methods measuring the rate of oxygen consumption in the presence of substrate [6] or on fluorimetric determinations [7], where homovanillic acid is converted into a highly fluorescent compound by the released H₂O₂ in the presence of peroxidase. All these methods are not giving information

C. Calinescu · M. A. Mateescu (✉)
Department of Chemistry and Centre BioMed,
Université du Québec à Montréal,
CP 8888, Succ. A,
Montréal, QC H3C 3P8, Canada
e-mail: mateescu.m-alexandru@uqam.ca

R. Federico
Department of Biology, 3rd University of Rome,
00146 Rome, Italy

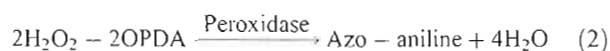
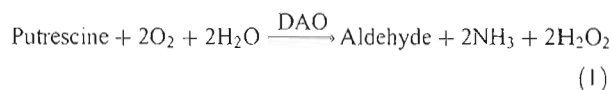
B. Mondovi
Department of Biochemical Sciences "Rossi-Fanelli",
University of Rome "La Sapienza",
00185 Rome, Italy

on the loss of molecular integrity of DAO (i.e., to acidic or proteolytic hydrolysis). Thus, supplemental information can be obtained using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) by monitoring the protein pattern (staining gels with Coomassie Blue) and the enzymatic activity (zymography).

There are several major advantages of polyacrylamide (PAA) gels, such as: the high homogeneity of the gels with the density which can be easily modified to allow the best enzymes separation. The gels can be stained with Coomassie Brilliant Blue for protein profile and, keeping the same running conditions, a zymographic pattern can be directly visualized in some specific conditions and the enzyme activity can be quantified by densitometry. The zymographic PAGE is easy to run and the results are highly reproducible. As the H_2O_2 is the product of almost all oxidases, the gel areas occupied by DAO after its electrophoretic separation can be visualized via a coupled peroxidase reaction. Peroxidase as second enzyme is widely used to detect oxidase-producing H_2O_2 in presence of oxidizable dyes as its second substrate. Frequently used as donor substrate of peroxidase are: tetramethyl benzidine [8], 3,3'-diaminobenzidine [9], *ortho*-dianisidine [10], and guaiacol [11]. The chromogenic guaiacol method is one of the most commonly used on gels. However, this method has the disadvantage that the bands are stable only for a short period, requiring stabilization by Coomassie Brilliant Blue [11]. Similarly, the 3,3'-diaminobenzidine may also be used as a peroxidase chromogenic substrate, but developed bands have to be intensified by other treatments [9].

Some previous reports concern amineoxidases staining on PAA gels. Thus, Houen and Leonardsen [12] developed a specific staining method for DAO activity in the presence of peroxidase. The diaminobenzidine inhibited DAO and gave rise to unspecific staining, the most suitable among the substrates used being 4-Cl-1-naphthol. Lee et al. [13] used a peroxidase-coupled reaction in the presence of 3-amino-9-ethylcarbazole to detect plasma amineoxidase activities after native polyacrylamide gel electrophoresis. In the mentioned studies, after the electrophoresis, the gels were kept in the presence of peroxidase solution to detect amineoxidase enzymatic activities. This present study proposes a method to detect the DAO enzymatic activity from *Lathyrus sativus* seedlings using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with the peroxidase immobilized in the PAA gel. This method allowed the study of DAO stability to proteolysis in simulated gastro-intestinal conditions. To our knowledge, this is the first zymographic assay reported for vegetal histaminase in the presence of SDS using the second enzyme (peroxydase) immobilized in the PAA gel. In the presented method, we proposed the *ortho*-phenylenediamine (OPDA) as donor substrate of peroxidase, with the formation of a stable product, azo-aniline, easily monitored

on gels. The redox dyes, once oxidized, change in color and some of them also in solubility (from soluble when reduced to insoluble when oxidized). In our case, in the presence of H_2O_2 and peroxidase, OPDA changed from colorless to a yellow-brown compound stable and easy to detect on the gel. The two coupled enzymatic reactions to monitor the enzymatic activity of DAO on the SDS polyacrylamide gel containing entrapped peroxidase are:



In our approach, the peroxidase is entrapped into the SDS polyacrylamide gels during polymerization and the DAO samples are deposited onto the gels for electrophoresis. After the electrophoretic run, gels are placed in solutions of putrescine (DAO substrate) and OPDA (peroxidase substrate). Both substrates diffuse into the gel and yellow-brown bands are developed *in situ*, corresponding to enzymatic activity of DAO.

A histaminase (DAO) of vegetal origin, more efficient than that of animal origin, was proposed for the general treatment of histamine-related pathologic conditions, such as allergic and septic shock, allergic asthma, anaphylaxis, allergic rhinitis and conjunctivitis, urticaria and atopic dermatitis, in which the histamine is the principal chemical mediator [14]. Plant histaminase can be obtained from different vegetal sources and can be used as a crude extract or as a purified enzyme. As previously shown with other copper oxidases (such as ceruloplasmin and serum bovine amine oxidase), which presented antioxidant, cardiomodulatory, and cardioprotective effects [15], vegetal DAO have beneficial effects in cardiac anaphylactic response [16] and in myocardial ischemia and reperfusion injury [17]. Plant histaminase has also some beneficial effects in asthma-like reaction [18], or in splanchnic artery occlusion/reperfusion injury [19]. As histamine and reactive oxygen species are involved in the pathophysiology of inflammatory bowel disease, hog kidney DAO had been intraperitoneally administered on experimental ulcerative colitis in rats [20], and the DAO treatment positively modified the inflammatory reaction. Thus, it is also expected that exogenous DAO could protect against oxidative damage [17–19], as reactive species also play an important role in inflammatory diseases. In this context, the vegetal DAO stability to proteolysis in the presence of digestive enzymes has to be known. A proteolysis study on a vegetal DAO purified from pea (*Pisum sativum*) seedlings was previously reported [21] in the presence of 0.01% pepsin (pH 2) and of

0.1% trypsin (pH 7.2). To our knowledge, there are no studies on vegetal histaminase in more acidic conditions (pH 1.2) and over longer periods in simulated intestinal fluid, in the presence of pancreatin (containing trypsin and other proteases, together with other various digestive enzymes such as amylase, lipase, ribonuclease) [22]. In this context, the aim of this work was also to study *in vitro* the behavior of DAO from *L. sativus* seedlings extract to proteolytic action of digestive enzymes, in simulated gastric and intestinal conditions, using the zymographic assay described above.

Experimental

Materials

1,4-Diaminobutane dihydrochloride (putrescine), *ortho*-phenylenediamine dihydrochloride, peroxidase type I (from horseradish, 96 purpurogallin units/mg solid), Bradford Reagent, pepsin (from porcine gastric mucosa, 882 units/mg protein), and pancreatin (from porcine pancreas) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Acrylamide, *N,N'*-methylene-bis-acrylamide and protein molecular weight standards (Broad Range) were from Bio-Rad Laboratory (Richmond, VA, USA).

Preparation of vegetal extract from *L. sativus* seedlings and purification of DAO

The vegetal extract and the purified DAO from grass pea *L. sativus* seedlings were prepared as previously described [23], with minor modifications. Briefly, 500 g of freshly collected shoots of etiolated *L. sativus* seedlings were homogenized in a Waring blender with 1 L of 30 mM NaH_2PO_4 (final pH 4.4), and then filtered. In these conditions, the DAO remains ionically linked to the insoluble fraction. The solid residue, mainly constituted by cell walls and vascular fibers, was washed with the same buffer and the enzyme was finally eluted from the solid residue with 500 mL of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7) and, then, centrifuged. The supernatant containing the DAO was lyophilized. The purification of DAO was done as previously described [23], onto a DE52-cellulose and a HiTrap SP Sepharose column.

Determination of protein concentration and of enzymatic activity of DAO preparations from *L. sativus* seedlings

Different concentrations of vegetal extract (1, 5, 10, 15, 25, 40 mg/mL) or of purified DAO (3 mg/mL) were kept for 2 h at 4 °C in phosphate buffer solution (PBS, pH 7.4)

under agitation and then, filtered and rapidly frozen. Protein concentrations of the vegetal extract and of the purified DAO were determined by the method of Bradford [24], using bovine serum albumin as standard. The enzymatic activity of DAO was assayed spectrophotometrically with the same two coupled reactions as for zymography assay, in the presence of putrescine (30 mM) as substrate for DAO and of peroxidase as a second enzyme reaction, where OPDA is enzymatically oxidized into a colored compound (azo-aniline) by the released H_2O_2 . The incubation mixture contained 640 μL of PBS (10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4), 10 μL of peroxidase solution (0.1 mg/mL), 50 μL of OPDA solution (30 mM), 200 μL of putrescine solution (30 mM) and 100 μL of DAO samples of unknown concentrations. The mixtures containing PBS, peroxidase, OPDA, and putrescine were incubated for 5 min at 37 °C, and then, the DAO samples were added. The enzymatic reactions were incubated at 37 °C for 10 min, when 100 μL of HCl (4 M) were added and the final absorbance was read at 484 nm using a Beckman DU[®]-6 spectrophotometer. The standard curve was prepared with serial concentrations of H_2O_2 from 0 to 68 μM .

One enzymatic unit (EU) of DAO is defined as the amount of enzyme catalyzing the oxidation of 1.0 μmole of putrescine per 10 min at pH 7.4, at 37 °C.

Protocollysis of DAO

DAO was incubated in simulated gastro-intestinal conditions, with and without pepsin in simulated gastric fluid (SGF) or with and without pancreatin in simulated intestinal fluid (SIF) [22]. Samples of 40 mg of vegetal extract powder were each incubated for 0, 5, 10, 15, 30, 60 and 120 min in 875 μL SGF (pH 1.2), containing or not pepsin (0.32% powder with 882 units/mg protein). In parallel, the same amounts of vegetal extract (40 mg) were each incubated for 0, 1, 2, 4, 6, 8, and 10 h in 1 mL SIF (pH 6.8), containing or not pancreatin. The SIF containing pancreatin only was also incubated (as control) for the same periods of time as above. The incubations were done at 37 °C and 50 rpm using an incubator shaker (series 25D, New Brunswick Scientific Co., New Jersey, USA).

After each indicated SGF period, every SGF sample was neutralized with 125 μL of 6.66% sodium bicarbonate solution and maintained under agitation for 2 h at 4 °C. Then, the neutralized SGF samples (final concentration, 40 mg/mL) were filtered and frozen. The SIF samples were only filtered and rapidly frozen. Purified DAO (3 mg/mL) was incubated only for 10 h in SIF containing pancreatin (pH 6.8, 37 °C and 50 rpm), then filtered and rapidly frozen.

The DAO standards were represented by the vegetal extract (40 mg/mL) or by the purified DAO (3 mg/mL) in

PBS solution (pH 7.4). Both standards were kept for 2 h under agitation at 4 °C and then filtered and frozen.

All the samples of histaminase were run in SDS-PAGE under non-reducing conditions.

Peroxidase entrapment in polyacrylamide gels

For the enzymatic detection of DAO on gels via the peroxidase-coupled reaction, the peroxidase was entrapped in the PAA gels. Thus, during the 8% PAA resolving gels preparation, 1 mL of horseradish peroxidase (1 mg/mL) was added to the gel solutions prior to polymerization (final volume of 5 mL). Stacking gels contained no peroxidase. To verify the homogenous distribution of peroxidase in the polymerized gel, an 8% PAA resolving gel containing peroxidase (19.2 purpurogallin units) was electrophoretically tested for 1 h (room temperature, 120 V) with no samples loaded on it. Then, the gel was immersed in a staining solution containing equal volumes of H₂O₂ (30 mM) and OPDA (30 mM) and kept under weak agitation for 1 h. Another 8% PAA resolving gel, containing no entrapped peroxidase and no samples loaded on it was treated in the same conditions (control).

Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis

The DAO protein content and the enzymatic activity of the vegetal samples incubated in PBS or in simulated gastric and intestinal conditions were evaluated by SDS-PAGE, using the electrophoresis system Mini-Protein II (Bio-Rad). Each sample was run in two PAA gels: one with entrapped peroxidase for zymography and another peroxidase-free for protein pattern.

Thus, the samples of vegetal extract at different concentrations in PBS (1, 5, 10, 15, 25, 40 mg/mL), the neutralized SGF samples (40 mg vegetal extract/mL in SGF, with or without pepsin), the SIF samples (40 mg vegetal extract/mL in SIF, with or without pancreatin) and the samples of purified DAO (3 mg/mL in SIF with pancreatin), prepared as described above, were defrosted and treated (1:1, v/v) with SDS electrophoresis sample buffer containing 0.12 M Tris–HCl (pH 6.8), 4% SDS (138 mM), 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue and no beta-mercaptoethanol. The mixtures were not heated. Then, 30 µL of each treated sample were loaded and resolved by SDS-PAGE for 1 h and 15 min (room temperature, 120 V) on 8% PAA peroxidase-free gels for Coomassie Blue staining of proteins or on 8% PAA gels containing entrapped peroxidase (19.2 purpurogallin units) for zymographic revelation of DAO enzymatic activity. The electrophoresis buffer used in electrophoresis runs contained 0.025 M Tris–Base, 0.192 M glycine, and 0.1% SDS.

The molecular weight protein standards were diluted in SDS reducing sample buffer (with beta-mercaptoethanol), heated for 5 min at 95 °C, then cooled and loaded 10 µL/well to the PAA gel, as indicated in specifications from Bio-Rad.

Coomassie Blue protein staining

After electrophoresis, the 8% PAA gels were incubated for 30 min (mild agitation) in a fixation solution containing methanol:acetic acid:water (50/10/40, v/v/v) followed by 1 h of staining with 0.5% Coomassie Brilliant Blue G-250 in a methanol:acetic acid:water (40/10/50, v/v/v) solution.

Detection of DAO enzymatic activity on polyacrylamide gels

After electrophoresis, the PAA gels containing entrapped peroxidase and electrophoretically separated DAO samples, were rinsed with distilled water and placed in a solution of putrescine (30 mM) for a few minutes. Then, the incubation medium was completed with an equal volume of OPDA solution (17 mM). The DAO enzymatic activity was detected on PAA gels (zymographic bands) in function of newly produced substrate (H₂O₂) and in saturating concentration of chromogenic substrate (OPDA). Each substrate solution was prepared in PBS (pH 7.4) and kept at 4 °C before utilization. The gels immersed in the two mentioned solutions were incubated at 37 °C (1 h) under dark conditions and weak agitation. The position of DAO enzymatic activity bands on gels (zymograms) was determined by comparison of the electrophoretic patterns obtained from Coomassie staining, using DAO in PBS solution (pH 7.4) as standard. The densitometry image analysis of gel bands was carried out using the *Quantity One* program (Bio-Rad). The DAO enzymatic activity measured by densitometry of bands was correlated with the DAO initial enzymatic activity (DAO in PBS, pH 7.4), spectrophotometrically determined. The DAO percentages were reported to standard, considering the standard (DAO in PBS, pH 7.4) as 100%.

Influence of SDS on the enzymatic activity of DAO

The estimation of the DAO enzymatic activities monitored on the zymographic gels (EU/electrophoretic load of 30 µL, in the presence and the absence of SDS) and the dependence of DAO specific enzymatic activity on the time of incubation with SDS was studied spectrophotometrically at 25 °C, in the same conditions as for electrophoresis. Thus, samples of vegetal extract in PBS (1, 5, 10, 15, 25, 40 mg/mL) were treated (1:1, v/v) with an electrophoresis buffer containing 0.12 M Tris–HCl (pH 6.8), 20%

glycerol, in the presence or the absence of 4% SDS (138 mM), for the determination of the DAO enzymatic activities as EU/electrophoretic load of 30 μ L. The dependence of DAO specific enzymatic activity on the time of incubation was studied after 0, 30, 75, and 135 min at 25 °C, on a sample of 40 mg vegetal extract/mL, in the same electrophoresis buffer and in the presence or in the absence of SDS. The DAO enzymatic activities were determined by the same spectrophotometrical method described above, using the two coupled reactions in solution.

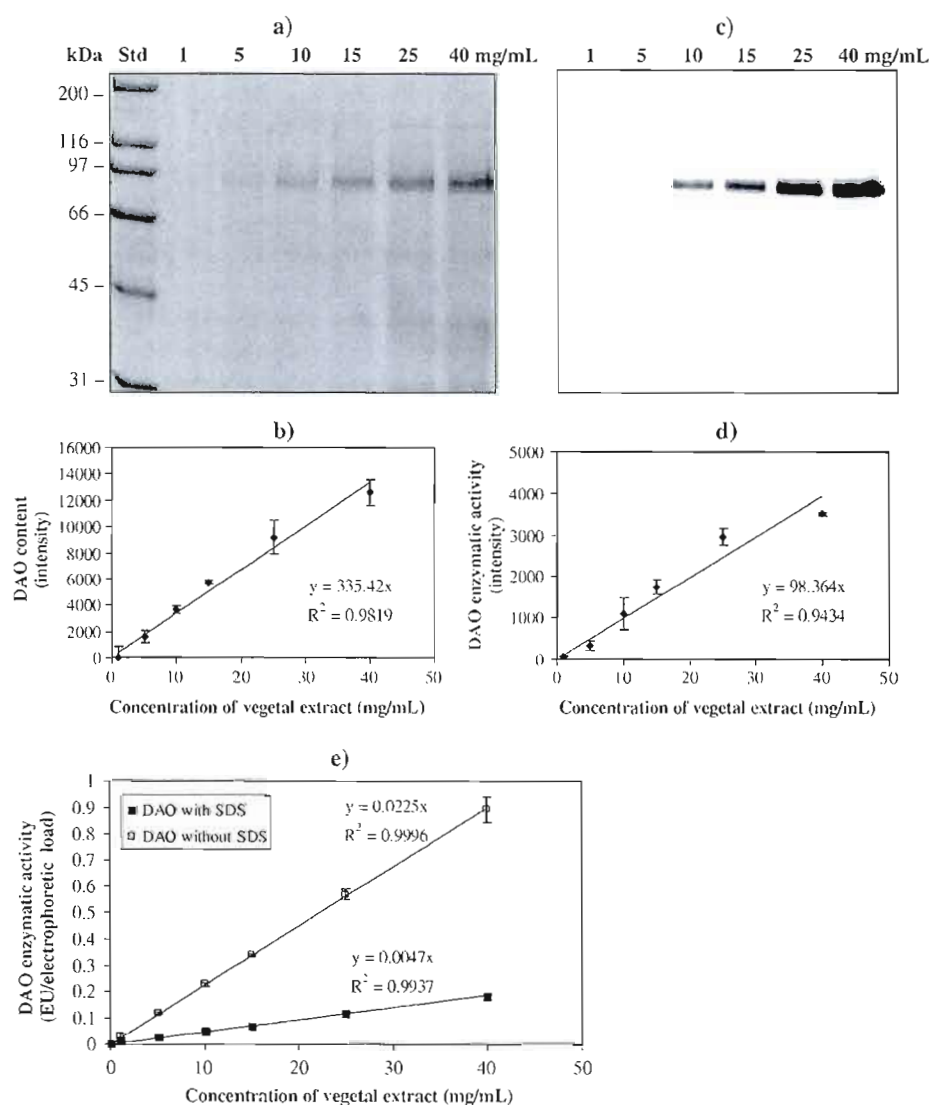
Results and discussion

The protein content of *L. sativus* vegetal extract, determined by Bradford assay [24], was in a linear dependency

($R^2=0.9978$) with the vegetal extract concentrations (1, 5, 10, 15, 25, 40 mg/mL), indicating a good homogeneity of the extract powder (data not shown). The same concentrations of vegetal extract as mentioned above (with a total protein content of 15 ± 1.4 μ g/mL, 132 ± 8 μ g/mL, 302 ± 13 μ g/mL, 435 ± 17 μ g/mL, 719 ± 33 μ g/mL and, respectively, $1,091\pm27$ μ g/mL) were then used on electrophoretic gels to follow the DAO protein content (Coomassie coloration) and the DAO enzymatic activity (zymography). The same migration patterns of molecular weight standards and of vegetal extract were obtained for either gels containing or not entrapped peroxidase after Coomassie coloration (data not shown). Thus, throughout the whole study, we used gels containing entrapped peroxidase only for the enzymatic activity evaluation of DAO (zymography).

To our knowledge, this is the first zymographic assay for plant histaminase with the second enzyme (peroxidase)

Fig. 1 Electrophoretic pattern of vegetal extract from *L. sativus* seedlings. Coomassie staining: **a** SDS-PAGE (8% PAA resolving gel without peroxidase) of different concentrations of DAO vegetal extract (1, 5, 10, 15, 25, 40 mg powder/mL), treated (1:1, v/v) with non-reducing SDS loading buffer (30 μ L/well). The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue G-250. **b** Image analysis of DAO bands intensity with the Quantity One program. $n=3$. Zymographic DAO enzymatic activities: **c** different concentrations of DAO vegetal extract (1, 5, 10, 15, 25, 40 mg powder/mL), treated (1:1, v/v) with non-reducing SDS loading buffer (30 μ L/well). Oxidase activity was directly monitored on 8% PAA gels (containing entrapped peroxidase) after the electrophoretic run, in the presence of putrescine and *ortho*-phenylenediamine. **d** Image analysis of DAO bands intensity (enzymatic activity) with the Quantity One program. **e** Enzymatic activities of DAO on gel (EU/electrophoretic load of 30 μ L), spectrophotometrically determined, in function of the vegetal extract concentrations. Protein content of vegetal extract: 15 ± 1.4 μ g/mL (1 mg/mL), 132 ± 8 μ g/mL (5 mg/mL), 302 ± 13 μ g/mL (10 mg/mL), 435 ± 17 μ g/mL (15 mg/mL), 719 ± 33 μ g/mL (25 mg/mL), $1,091\pm27$ μ g/mL (40 mg/mL). $n=3$



entrapped in the PAA gel. As control, after an electrophoresis run without any DAO-loaded samples, the PAA resolving gel, containing entrapped peroxidase, was colored in a few minutes and in a homogenous manner in the presence of H_2O_2 and OPDA solutions. This indicated that the entrapped peroxidase still kept its enzymatic activity and that it was uniformly distributed in the PAA resolving gel. The gel without entrapped peroxidase, kept under the same conditions as above, remained totally transparent even after 1 h of incubation (data not shown). There are lots of applications with peroxidase physically entrapped in gels. In our case, the enzyme was immobilized during polymerization of PAA gels (a covalent immobilization during the polymerization process of acrylamide gels involving double bonds of the prosthetic group of peroxidase is not excluded). Thus, despite the molecular weight of peroxidase (40 kDa), much lower than that of DAO from *L. sativus* (approximately 150 kDa), peroxidase did not migrate during the electrophoresis run, suggesting its immobilization into the PAA gel during the polymerization process, a fact also reported by Ugarova et al. [25], who studied the catalytic properties and stability of immobilized horseradish peroxidase into a PAA gel.

It is known that in denaturing SDS-PAGE, migration of proteins is determined primarily on their molecular mass. A single band in reducing SDS-PAGE corresponding to a molecular mass of 72 kDa [23] was reported for DAO from *L. sativus*. In non-reducing SDS-PAGE (without beta-mercaptoethanol and without heating of samples, which both can disrupt the folded structure of enzyme), the electrophoretic mobility of proteins depends more on their hydrodynamic size. Thus, the SDS-PAGE pattern of the analyzed vegetal extract presented a major protein band, identified as DAO, whose growing intensity was in function of the concentration of the loaded vegetal extract (Fig. 1a). Gel images were densitometrically analyzed using the *Quantity One* program and a linear variation of histaminase content (protein band intensity) with the concentrations of vegetal extract was obtained (Fig. 1b). The combination of SDS-PAGE protein pattern (Coomassie staining) and of zymogram technique allowed to determine comparatively the position of zymographic bands corresponding to DAO enzymatic activity (Fig. 1c). The H_2O_2 , the product of enzyme reaction of DAO and substrate for peroxidase, will generate, in the presence of OPDA dye (second substrate for peroxidase), a colored oxidized product (azo-aniline) with intensity related to the amount of released H_2O_2 resulted from DAO enzyme activity. The oxidized product of the two coupled enzymatic reactions is thus constantly accumulated on the gel. In all cases, the zymograms revealed only a single yellow-brown band on a colorless background, attributed to the DAO activity of histaminase, with intensity of bands

growing in function of the concentration of vegetal extract, showing a linear dependency (Fig. 1d). Normally, the SDS contributes to unfold an enzyme by interacting with the non-polar amino acid side-chains situated in the interior of the folded protein structure. In our non-reducing conditions (without beta-mercaptoethanol and without heating of samples), the DAO still retained its enzymatic activity in the presence of SDS, a linear dependency being obtained between DAO enzymatic activity (EU/electrophoretic load) and the concentrations of the vegetal extract, either in the presence or the absence of SDS (Fig. 1e).

The SDS is known to interact with most of water soluble proteins to form protein-detergent complexes [26]. Many enzymes lose their activity in the presence of SDS and some are activated [27, 28]. Gebicka [29] showed that horseradish peroxidase in solution is relatively resistant against SDS, the enzyme retaining its full activity up to 20 min when incubated at room temperature with 100 mM SDS, and still retained 63% of its activity after the next 4 h. To our knowledge, there are no studies on vegetal histaminase in the presence of SDS. Since in our case, it was observed that DAO still retained part of its enzymatic activity on PAA gels in the presence of SDS (Fig. 1c–e), it was of interest to study the stability of vegetal DAO in solution in the presence of SDS, using the same conditions as for electrophoresis. Thus, in the absence of SDS, the enzymatic activity of DAO was kept constant during the first 30 min of incubation (25°C), and then, its activity significantly diminished (Fig. 2). In the presence of 69 mM SDS, the DAO specific activity was rapidly reduced, but then being stabilized for the entire period of 135 min of

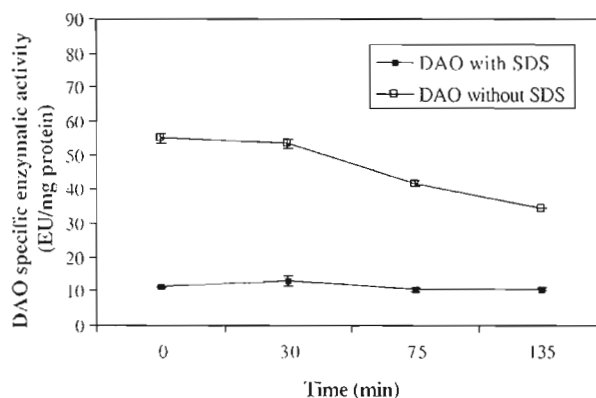
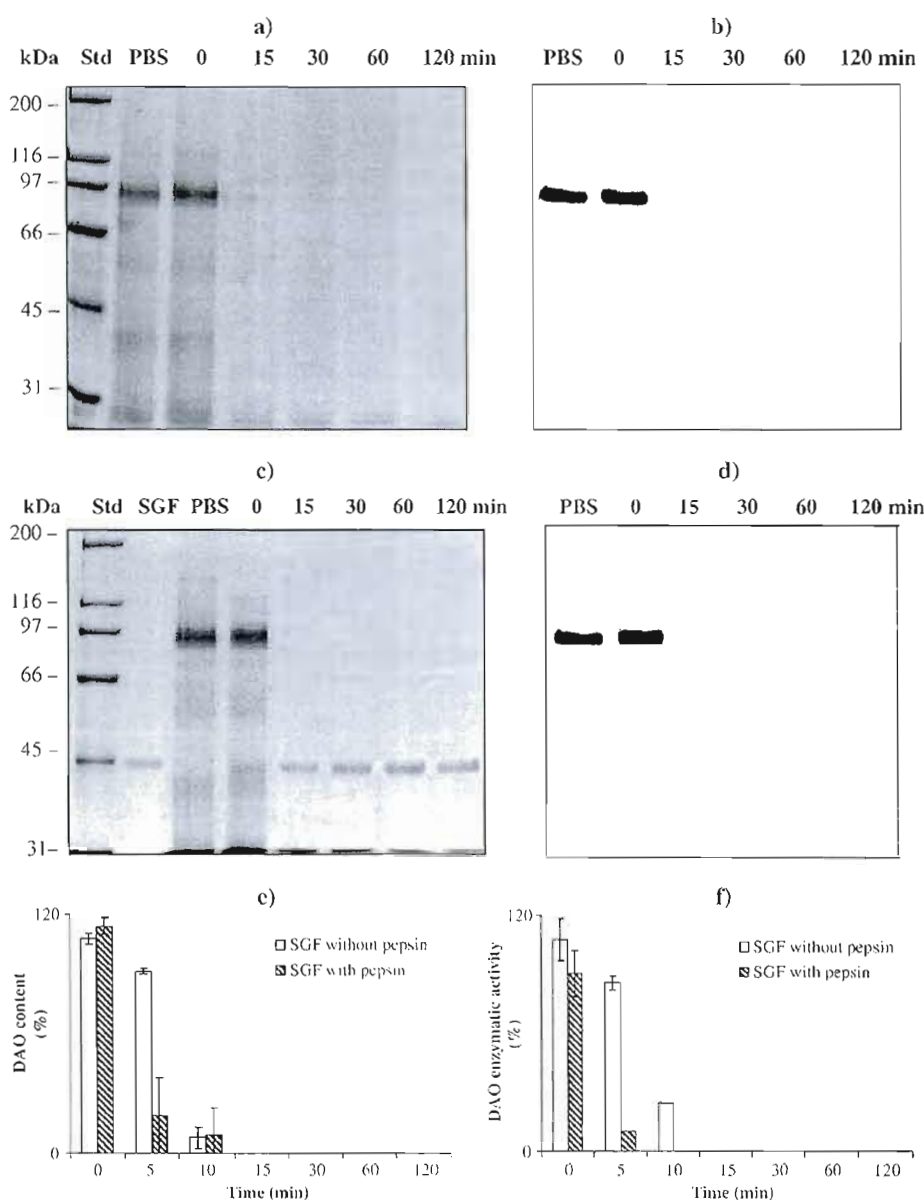


Fig. 2 The influence of sodium dodecyl sulfate on the enzymatic activity of DAO. The specific enzymatic activity of DAO (EU/mg protein) from vegetal extract (40 mg/mL, containing $1.091 \pm 27 \mu\text{g}$ total protein/mL) was measured at 25 °C in a solution containing 60 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol, in the presence or the absence of 69 mM SDS. The DAO specific enzymatic activities were determined spectrophotometrically, as described before, with putrescine as DAO substrate and *ortho*-phenylenediamine as co-substrate for peroxidase; $n=3$

incubation in SDS (Fig. 2). This stabilization of the enzymatic activity in the presence of SDS for more than 2 h is important, since the revelation of enzymatic activity of DAO on PAA gels was done after 75 min of electrophoresis and during 60 min of gel incubation. The decrease of DAO enzymatic activity by SDS was also settled as percentage from the original DAO specific activity (in the absence of SDS), which was considered as 100%. Thus, 30% of DAO enzymatic activity was still detected after 135 min of incubation in the presence of SDS. The presence of SDS in the electrophoresis conditions (SDS-PAGE) contributed to a better resolution of DAO separation comparatively to native PAGE (data not shown), improving mobility and stabilizing the DAO.

The behavior of DAO from *L. sativus* seedlings extract (40 mg vegetal extract/mL containing $1,091 \pm 27$ μ g total protein/mL) under proteolytic action of digestive enzymes was studied in SGF (with or without pepsin) and in SIF (with or without pancreatin) [22]. Thus, DAO electrophoretic bands corresponding to its protein content and its enzymatic activity were revealed on electrophoretic gels for DAO in PBS (pH 7.4) and in neutralized SGF (with or without pepsin), at 0 min of SGF treatment (Fig. 3). In acidic conditions (pH 1.2), the degradation and inactivation of DAO (with no detectable DAO enzymatic activity on gels) were observed after 15 min of incubation at 37 °C and 50 rpm (Fig. 3a, b). The pH of an enzyme medium can affect the state of ionization of amino acid side-chains that

Fig. 3 Electrophoretic pattern of diamine oxidase from the vegetal extract of *L. sativus* seedlings in simulated gastric fluid (SGF, pH 1.2). SGF without pepsin (a, b) and SGF with pepsin (c, d). Coomassie staining gels without peroxidase (a, c) and DAO zymographic gels containing entrapped peroxidase (b, d) of vegetal extract (40 mg/mL, containing $1,091 \pm 27$ μ g total protein/mL) from *L. sativus* seedlings in PBS, pH 7.4 and in SGF (up to 120 min of incubation). The vegetal extract samples in SGF (with or without pepsin) were neutralized with sodium bicarbonate, and then treated with non-reducing SDS loading buffer (1:1, v/v) and loaded 30 μ L/well. DAO protein content (e) and DAO enzymatic activity (f) in SGF. Results are expressed in percentage, considering DAO in PBS as 100%. *Quantity One* program was used for densitometric analysis of gel images. The DAO specific enzymatic activity of 11.21 ± 0.31 EU/mg protein, determined spectrophotometrically in PBS solution (in the presence of SDS), was considered as 100%; $n=3$



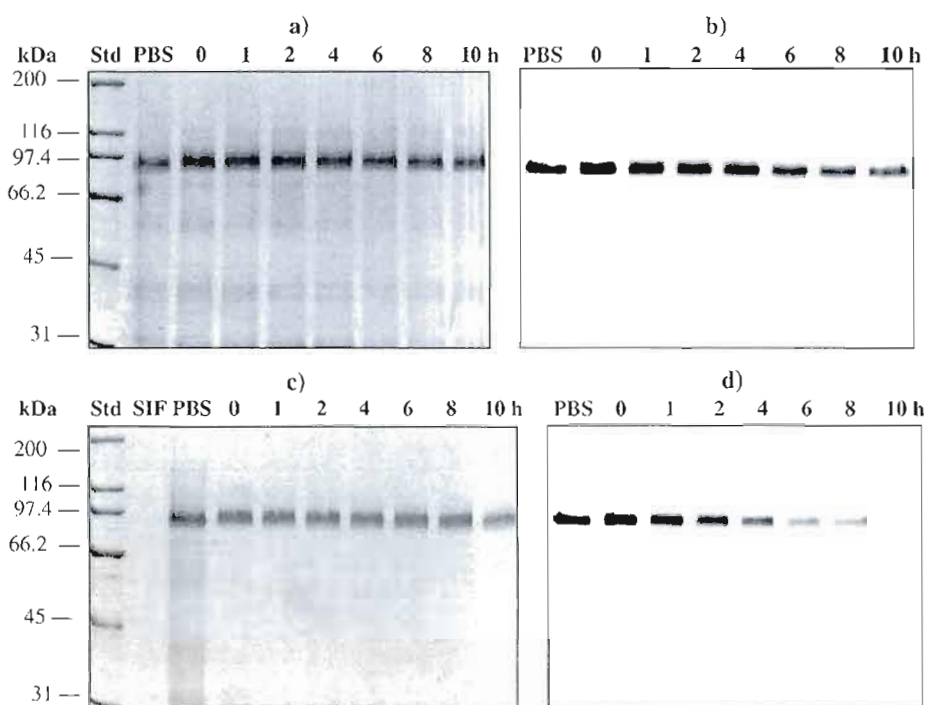
may be involved in the maintenance of the folded structure. Furthermore, in strong acidic conditions (pH 1.2), a possible hydrolysis can also occur with the degradation of the proteins contained in the vegetal extract (Fig. 3a). Federico et al. [21] reported that at pH 2 and in the presence of pepsin (0.01%, 4,500 units/mg), purified histaminase from pea seedlings (*P. sativum*) was partially inactivated after 30 min of incubation (14% remaining enzymatic activity), with complete loss of activity after 60 min of incubation. In more acidic conditions (pH 1.2) and in the presence of pepsin (0.32% with 882 units/mg protein) [22], the total degradation of all the proteins present in the vegetal extract from *L. sativus* seedlings was observed after 15 min of incubation (Fig. 3c), with no detectable DAO enzymatic activity (Fig. 3d). The remaining band found for samples incubated at 15, 30, 60, and 120 min corresponds to pepsin which is stable in gastric acidity (Fig. 3c).

The time course in SGF, in the absence or in the presence of pepsin, indicated a fast degradation of DAO in early stage of incubation (Fig. 3e,f). Thus, after 5 min of acidic incubation, a loss of about 10% of DAO content and of 15% of DAO activity detected on gels was observed. At 10 min, the degradation of DAO was more advanced, and, after 15 min, its degradation was complete. In the presence of pepsin, the DAO degradation was even faster, with total loss of its enzymatic activity in less than 10 min.

Previous proteolysis studies with other amine oxidases, such as swine kidney diamine oxidase (SKDAO) and bovine serum amine oxidase (BSAO), were done separately

with trypsin, pronase, or with thermolysin for a period of up to 4 h [30]. The SKDAO in the presence of trypsin or pronase partially lost its enzymatic activity in the first 60 min, followed by stabilization during the next 3 h of proteolysis. In the case of trypsin, the SKDAO activity was stabilized at about 50% after 4 h of hydrolysis. In the presence of thermolysin, the SKDAO lost more than 60% of its initial activity after 4 h of proteolysis. Concerning the BSAO, the pronase exerted the highest denaturing effect, with only 40% remaining enzymatic activity after 4 h of hydrolysis. There are not many studies on vegetal histaminase stability to proteolysis in the presence of pancreatic enzymes. Federico et al. [21] tested purified vegetal histaminase from *P. sativum* seedlings only for 60 min in the presence of trypsin, when 67% of its enzymatic activity was retained. In our study, pancreatin, containing enzymes such as trypsin, chymotrypsin, endopeptidases, exopeptidases, carboxypeptidases, as well as other digestive enzymes (amylase, lipase, ribonuclease), was used to test the proteolysis stability of DAO from *L. sativus* over longer periods, up to 10 h. During 10 h of vegetal extract incubation in pancreatin-free SIF (pH 6.8) at 37 °C and 50 rpm, the DAO protein content was kept constant as indicated after Coomassie Blue staining (Fig. 4a), with a slight diminution of its enzymatic activity on the corresponding zymogram (Fig. 4b). Interestingly, in the presence of pancreatin, in the same conditions as before (SIF, pH 6.8), the DAO from the vegetal extract was still present after 10 h of incubation, as indicated by Coomassie

Fig. 4 Stability of diamine oxidase from *L. sativus* vegetal extract in simulated intestinal fluid (SIF, pH 6.8). SIF without pancreatin (a, b) and SIF with pancreatin (c, d). Coomassie-stained gels without peroxidase (a, c) and DAO zymographic gels containing entrapped peroxidase (b, d) of vegetal extract (40 mg/mL, containing $1,091 \pm 27$ μ g total protein/mL) from *L. sativus* seedlings in PBS, pH 7.4 and in SIF (up to 10 h of incubation). The vegetal extract samples in SIF (with or without pancreatin) were treated with non-reducing SDS loading buffer (1:1, v/v) and loaded 30 μ L/well; $n=3$



protein staining (Fig. 4c). The corresponding zymogram still showed a band ascribed to DAO enzymatic activity even after 10 h of incubation in the presence of pancreatin (Fig. 4d), indicating a certain stability of DAO to pancreatin proteolysis. As control, SIF containing pancreatin only was spectrophotometrically checked for amine oxidase, and no activity was found over the 10 h of incubation (data not shown). This confirms the lack of additional interfering amine oxidases due to eventual microbial contamination during the long incubation. The densitometric analysis (Fig. 5) confirmed that the DAO protein content was almost constant either in the absence or presence of pancreatin, with a slight decrease in the presence of pancreatin (Fig. 5a). After 10 h of incubation at 37 °C (50 rpm), the DAO activity from the vegetal extract was 44.7% in SIF

without pancreatin and 13.6% in the presence of pancreatin (Fig. 5b).

To evaluate the influence of the presence of the other proteins from the *L. sativus* vegetal extract on DAO proteolysis, a purified DAO preparation (containing 413 ± 9 µg protein/mL with a specific enzymatic activity of 110.43 ± 2.01 EU/mg protein, determined in the presence of SDS) from the same vegetal source was also tested for 10 h (37 °C, 50 rpm) only in the presence of pancreatin (SIF, pH 6.8). The densitometric analysis of purified DAO protein content and of its enzymatic activity was realized, considering the purified DAO in PBS (pH 7.4) as standard (100%). After 10 h of incubation in the presence of pancreatin, the protein content of purified DAO diminished to 59.7% (data not shown), more than in the case of DAO from vegetal extract, which decreased to 78.7% after 10 h (Fig. 5a), suggesting a higher susceptibility at proteolysis of the purified histaminase samples. Concerning the DAO enzymatic activity, after 10 h of incubation in the same conditions as before, only 4.65% of purified DAO activity was still present (data not shown), compared to 13.6% obtained with the vegetal extract (Fig. 5b). These results suggest a possible protection of DAO afforded by the other proteins present in the vegetal extract or a possible presence of some protease inhibitors in the vegetal extract able to partially protect the DAO against pancreatin proteolysis. The elucidation of these aspects, explaining better stability to proteolysis in the case of the vegetal extract, will be the object of a further investigation.

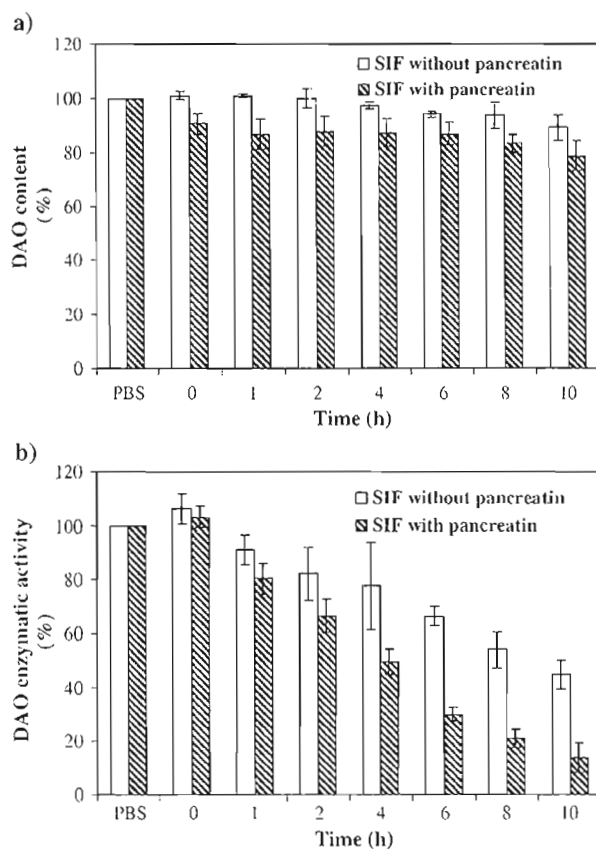


Fig. 5 Densitometric analysis of diamine oxidase from *L. sativus* vegetal extract after incubation in simulated intestinal fluid (SIF, pH 6.8), with or without pancreatin. **a** DAO protein content (%). **b** DAO enzymatic activity (expressed in % from the specific activity of DAO in PBS). Results are expressed in percentage, considering DAO in PBS as 100%. *Quantity One* program was used for densitometric analysis of gel images. The vegetal extract (40 mg/mL) contained 1.091 ± 27 µg total protein/mL in PBS/SIF. The DAO specific enzymatic activity of 11.21 ± 0.31 EU/mg protein, determined spectrophotometrically in PBS (in the presence of SDS), was considered as 100%; $n = 3$

Conclusion

A zymographic method was developed for the monitoring of DAO activity on immobilized peroxidase in polyacrylamide gels, with putrescine as substrate of DAO and OPDA as second substrate for peroxidase. Combination of protein pattern obtained in SDS-PAGE with that of enzymatic activity obtained in zymography can give valuable information on protein stability and enzymatic activity of DAO. Furthermore, a correlation between the DAO content and its enzymatic activity from a vegetal extract can be established in different conditions (i.e., proteolysis). The data obtained by this method indicated a certain stability at proteolysis of vegetal DAO, an aspect which can be of interest for eventual therapeutic application of this enzyme. This method can also be used on native PAGE gels, as an alternative method to evaluate the DAO enzymatic activity.

Acknowledgments The graduate studentship from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) granted to Carmen Calinescu and support from CRIP (FORNT) are gratefully acknowledged. Thanks are due to Dr. Canh LeTien for useful discussions.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

References

- Mondovi B, Rotilio G, Finazzi A, Scioscia-Santoro A (1964) *Biochem J* 91:408–415
- Klinman JP, Mu D (1994) *Ann Rev Biochem* 63:299–344
- Tabor CW, Tabor H, Rosenthal SM (1954) *J Biol Chem* 208: 645–661
- Holt A, Sharman DF, Baker GB, Palcic MM (1997) *Anal Biochem* 244:384–392
- Kusche J, Richter H, Hesterberg R, Schmidt J, Lorenz W (1973) *Agents Actions* 3:148–156
- Befani O, Sabatini S, Mateescu MA, Mondovi B (1989) *Biochem Biophys Res Commun* 163:1168–1174
- Matsumoto T, Furuta T, Nimura Y, Suzuki O (1982) *Biochem Pharmacol* 31:2207–2209
- Mesulam M-M (1978) *J Histochem Cytochem* 26:106–117
- Iida R, Yasuda T, Nadano D, Kishi K (1990) *Electrophoresis* 11:852
- Rudrappa T, Lakshmanan V, Kaunain R, Singara NM, Neelwame B (2007) *Food Chem* 105:1312–1320
- Fieldes MA (1992) *Electrophoresis* 13:454
- Houen G, Leonardsen L (1992) *Anal Biochem* 204:296–299
- Lee M-H, Chuang M-T, Hou W-C (2002) *Electrophoresis* 23:2369–2372
- Mondovi B, Befani O, Federico R, Mateescu MA, Masini E, Mannaioni PF, Vannacci A (2002) *Int Patent Publ No: WO 2002/043745*
- Mateescu MA, Nadeau R (2009) In: Floris G, Mondovi B (eds) *Copper amine oxidases: structures, catalytic mechanisms, and role in pathophysiology*. CRC
- Masini E, Vannacci A, Marzocca C, Mannaioni PF, Befani O, Federico R, Toma A, Mondovi B (2002) *Biochem Biophys Res Commun* 296:840–846
- Masini E, Pierpaoli S, Marzocca C, Mannaioni PF, Pietrangeli P, Mateescu MA, Zelli M, Federico R, Mondovi B (2003) *Biochem Biophys Res Commun* 309:432–439
- Masini E, Vannacci A, Giannini L, Befani O, Nistri S, Mateescu MA, Mannaioni PF, Mondovi B, Federico R (2004) *Eur J Pharmacol* 502:253–264
- Masini E, Cuzzocrea S, Bani D, Mazzon E, Muja C, Mastroianni R, Fabrizi F, Pietrangeli P, Marcocci L, Mondovi B, Mannaioni PF, Federico R (2007) *Shock* 27:409–415
- Fogel WA, Lewinski A (2006) *Inflamm Res* 55:S63–S64
- Federico R, Befani O, Mondovi B, Mulhbach J, Mateescu MA (2000) *Inflamm Res* 49:S60–S61
- U.S. Pharmacopeia National Formulary U.S.P. XXIV, NF XIX, United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD, 2000
- Federico R, Cona A, Caliceti P, Veronese FM (2006) *J Control Rel* 115:168–174
- Bradford MM (1976) *Anal Biochem* 72:248–254
- Ugarova NN, Kershengol'ts BM, Artamonov ID, Berezin IV (1976) *Biokhimiia* 41:1662–1670
- Ibel K, May RP, Kirschner K, Szadkowski II, Mascher E, Lundahl P (1990) *Eur J Biochem* 190:311–318
- Schrock HL, Gennis RB (1977) *J Biol Chem* 252:5990–5995
- Moore BM, Flurkey WH (1990) *J Biol Chem* 265:4982–4988
- Gebicka L (1999) *Int J Biol Macromol* 24:69–74
- Mondovi B, Befani O, Mateescu MA (1992) *Life Chem Reports* 10:151–155

Carboxymethyl High Amylose Starch as Excipient Affording Resistance to Gastric Acidity for Bioactive Agents Oral Formulations

Carmen Calinescu, Louis-Philippe Massicotte, Jérôme Mulhbachter and Mircea-Alexandru Mateescu
Department of Chemistry and Biochemistry, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8
mateescu.m-alexandru@uqam.ca

ABSTRACT SUMMARY

The active agents (*Lactobacillus rhamnosus*, α -amylase) formulated as tablets with Carboxymethyl High Amylose Starch (CM-HAS) displayed higher stability after incubation in simulated gastric conditions (pH 1.2, pepsin) than the non-protected agents. Thus, CM-HAS appears to be an interesting excipient for bioactive agents transportation through the gastro-intestinal tract and gut delivery.

INTRODUCTION

Lactobacilli are Gram-positive lactic acid-producing bacteria that constitute a major part of the intestinal microflora in animals and humans. Lactic acid bacteria can be denatured by different factors such as the acidic medium and bile acids. Thus, oral formulations based on polymers have to protect the active agents (bacteria, enzymes) from the acidic/enzymatic gastric fluid and to deliver it to the intestinal mucosal site.

Polymeric carboxylated CM-HAS carriers are expected to change the cation for a proton in acidic (gastric) medium, resulting in a compact structure [1]. This ensures local (limited to surface surroundings) buffering properties and thus protects the active agent against acidic denaturation. When in neutral or weak alkaline media, the protonated form will change the proton for cations, facilitating hydration and swelling, and generating polymeric material dissolution, with release of the bioactive agent.

In this *in vitro* study, live *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) bacteria or α -amylase were directly incorporated in CM-HAS. The aims of the study were to evaluate whether CM-HAS can ensure the protection of the bioactive agents against acidic/enzymatic denaturation and their liberation in simulated intestinal fluids (SIF).

EXPERIMENTAL

Synthesis of polymeric derivatives (CM-HAS)

The derivatives were synthesized as described previously by Calinescu et al. [1]. The degree of substitution was determined by potentiometric titration of CM groups with 0.2 N NaOH solution and was expressed in mEquivalents of functional groups/g of polymeric powder (mEquiv/g).

Stability of α -amylase and *L. rhamnosus* bacteria formulated with CM-HAS in simulated gastric fluid (SGF)

Tablets (200 mg), based on CM-HAS and containing 10 mg of lyophilized *L. rhamnosus*

(approximately 10^9 bacteria) or 10 mg of α -amylase from *Bacillus species* (2560 units/mg protein), were formulated by direct compression at 2.5 T/cm². Tablets were placed individually in 50 mL of sterile SGF pH 1.2 [2] for different times at 37 °C (simulating the gastric passage), under agitation at 50 rpm. The viability of bacteria or the enzyme activity was evaluated after 60 and 120 min in SGF containing pepsin. After the appropriate period of incubation in SGF, the tablets were transferred into 50 mL of sterile PBS (pH 7.4), and then crushed.

The *L. rhamnosus* viability was determined by counting the number of CFU (colony forming units). For α -amylase activity, the reductimetric method of Noelting and Bernfeld [3] based on the DNS (dinitro salicylate reagent) was used.

Loading capacity of CM-HAS with α -amylase active agent

Tablets (200 mg), based on CM-HAS and containing 10, 40, 80, 120 and 160 mg of α -amylase were formulated by direct compression at 3.0 T/cm². Tablets were placed individually in 50 mL of SGF pH 1.2 containing pepsin, for one hour at 37 °C under agitation at 50 rpm, using an incubator shaker. After the appropriate incubation period in SGF, the amylolytic activity was determined by the method of Noelting and Bernfeld as above.

L. rhamnosus and α -amylase delivery in the simulated intestinal medium

Tablets (200 mg), based on CM-HAS and containing 10 mg of lyophilized *L. rhamnosus* or 10 mg of α -amylase, were formulated by direct compression at 2.5 T/cm². Tablets were placed individually in 50 mL of sterile SGF pH 1.2 for 1h and then transfer in SIF containing pancreatin [2] (*L. rhamnosus*) or in PBS solution, pH 7.2 (α -amylase) for 8h at 37 °C (50 rpm). Samples of 1 mL were taken after 1h in SGF and every hour in the SIF/PBS. The *L. rhamnosus* CFU number or the α -amylase activity was determined on each sample.

RESULTS AND DISCUSSION

Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS), with a substitution degree between 0.6-1.0 mEquiv. of CM-groups/g polymer was previously introduced as excipient for oral tablet formulation of bioactive agents.

The *L. rhamnosus* viability tests showed that the polymeric excipient was able to protect the bacteria against 120 min of acidic denaturation (Fig. 1a) when formulated as tablets. For the free *L.*

rhamnosus suspension, no viable bacteria were observed after 1 and 2h of incubation in acidic medium (pH 1.2). This assay also showed that non-formulated bacteria can not persist in SGF (pH 1.2) for 60 min or longer whereas the CM-HAS can protect the bacteria in SGF medium for 2h.

The enzymatic assays showed that, when formulated with CM-HAS, the polymeric excipient was able to afford a considerable protection to the α -amylase enzyme against acidic denaturation for 2 h, whereas the free enzyme was totally inactivated (Fig. 1b). After 120 min, the enzyme formulated with CM-HAS conserved 56% of her initial activity, whereas for the free, unprotected α -amylase, no activity at all was observed after 1h in SGF (pH 1.2).

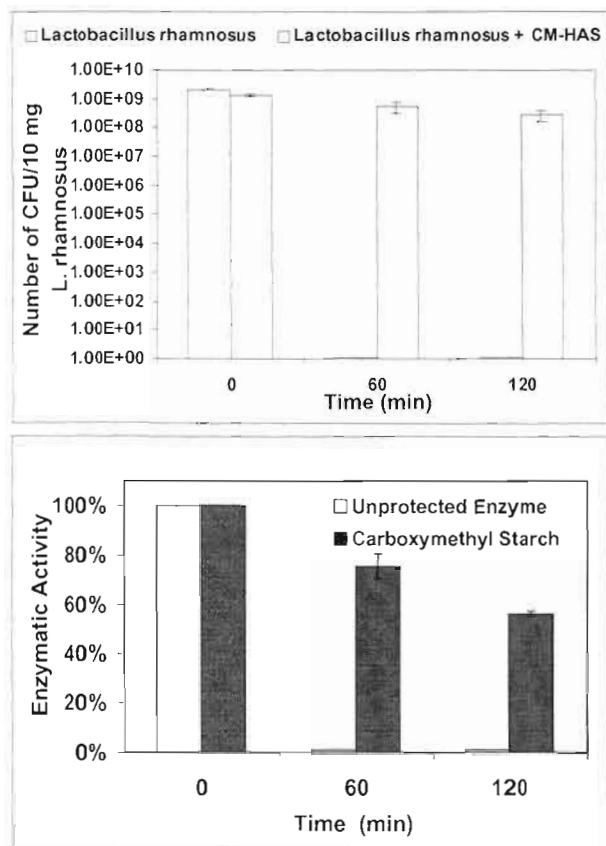


Fig. 1. Stability of *L. rhamnosus* bacteria (a) and α -amylase (b) formulated with CM-HAS in simulated gastric fluid (n=3)

It was found that tablets were in good shape and the α -amylase activity preserved after 1h incubation in SGF, even when loaded with 80 % active agent (Fig. 2). This aspect is important for the further development, showing a high loading capacity of these pharmaceutical formulations.

The release of the bacteria or enzyme was clearly related to tablet swelling and dependent on the substitution degree.

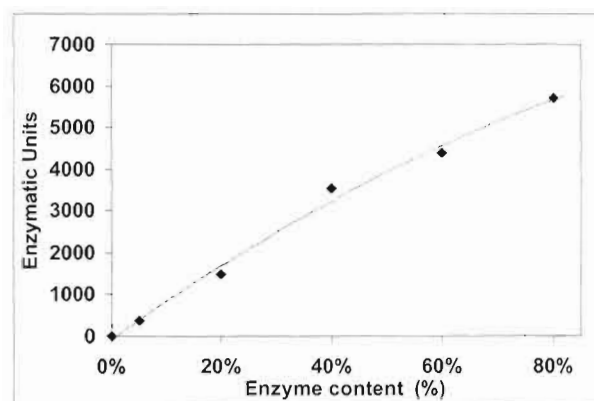


Fig. 2. Liberation of α -amylase formulated with CM-HAS in PBS solution (pH 7.2).

For the liberation of α -amylase, practically no enzymatic activities were detected after 1h of liberation in SGF. An α -amylase liberation from CM-HAS tablets was observed after 1h in phosphate buffer and the maximum of activity in the medium was reached after 2h of release in phosphate buffer (data not shown).

No viable bacteria were liberated after 1h in SGF nor in the first hour in SIF. The gel forming around the tablet, which may generate a delayed liberation, could explain this lack of bacterial or enzyme release. A bacterial liberation from CM-HAS tablets was observed after 2h in SIF. This liberation seems related to the swelling and erosion of the polymeric matrix (data not shown).

CONCLUSION

The data presented on a Gram positive *Lactobacillus rhamnosus* are in good agreement with those obtained with the Gram negative *Escherichia coli*. The CM-HAS also allows the formulation of enzymes (here α -amylase, a therapeutic enzyme orally administered). CM-HAS appears to be an interesting excipient for protecting bioactive agents from the gastric degradation and allowing their delivery in the gut, opening interesting perspectives for oral therapeutic formulations.

REFERENCES

- [1] C. Calinescu, J. Mulhbach, É. Nadeau, J. M. Fairbrother, M. A. Mateescu, Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipient for *Escherichia coli* oral formulations, Eur. J. Pharm. Biopharm. (2005) *In press*.
- [2] U. S. Pharmacopeia National Formulary U.S.P. XXIV, NF XIX, United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD, 2000.
- [3] G. Noelting, P. Bernfeld, Diastatic enzymes. III. β amylase: determination of activity and control of absence of α -amylase. Helv. Chim. Acta. 31 (1948) 286-290.

Carboxymethyl High Amylose Starch Excipient for the F4 *Fimbriae* Gastro-Resistant Oral Formulation

Carmen Calinescu¹, Jérôme Mulhbachter¹, Éric Nadeau², John Fairbrother² and Mircea-Alexandru Mateescu¹

¹ Department of Chemistry and Biochemistry, Université du Québec à Montréal (Québec) Canada, H3C 3P8
mateescu.m-alexandru@uqam.ca

² Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe (Québec) Canada, J2S 7C6

Abstract summary

F4 *fimbriae* formulated as tablets with Carboxymethyl High Amylose Starch (CM-HAS) excipient displayed a higher stability after two hours of incubation in simulated gastric conditions than the non-protected F4. Thus, CM-HAS appears to be an interesting excipient for bioactive agents transportation through the gastrointestinal tract and small intestine delivery.

Introduction

F4 *fimbriae* are long filamentous polymeric surface proteins of enterotoxigenic *Escherichia coli*, which are responsible for diarrhea and mortality in neonatal and recently weaned pigs. Orally administered purified F4 *fimbriae* are able to bind specific receptors and to induce an intestinal mucosal immune response [1]. It is well known that low pH and proteases can break down proteins. Therefore, resistance of the F4 *fimbriae* to gastric pH and digestion by pepsin is crucial. Thus, oral formulations based on polymers have to protect the bioactive agent from the acidic/enzymatic gastric fluid and to deliver it to the intestinal mucosal site.

This *in vitro* study presents the F4 *fimbriae* formulated with CM-HAS in tablet form. The CM-HAS tablets are compact in simulated gastric fluid (SGF) and thus, they can afford protection of the bioactive agent against acidic/enzymatic media. In weak alkaline simulated intestinal media, the protonated CM-HAS will change the proton for cations, facilitating hydration, swelling and dissolution of polymeric material with release of the bioactive agent.

The aim of this study was to evaluate whether CM-HAS can afford protection of F4 *fimbriae* against acidic/enzymatic denaturation and their liberation in simulated intestinal fluid (SIF).

Experimental methods

Synthesis of CM-HAS polymeric material

The derivative was synthesized as described previously by Calinescu et al. [2]. The substitution degree was determined by potentiometric titration of carboxymethyl (CM) groups with 0.2 N NaOH solution and was expressed as number of CM functional groups/100 glucosidic units.

Stability of free and formulated F4 *fimbriae* with CM-HAS in simulated gastric fluid (SGF)

Purified F4 *fimbriae* (2 mg) were formulated with CM-HAS in tablets (200 mg) by direct compression (2.5 T/cm²). The free and formulated F4 *fimbriae* were placed individually in SGF containing pepsin [3] for different times at 37 °C and 50 rpm (simulating the gastric passage). The stability of *fimbriae* in SGF was checked after 30, 60, 90 and 120 min of free F4 incubation and only after 120 min of formulated F4 incubation in SGF. The F4 *fimbriae* integrity was evaluated by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE: proteins stained by Coomassie blue) followed by western blotting analysis.

Free F4 *fimbriae* stability in simulated intestinal fluid (SIF)

Purified F4 *fimbriae* (2 mg) were incubated for 5 h in SIF, at 37 °C and 50 rpm. Samples were taken after every hour of incubation and the integrity of *fimbriae* in SIF was evaluated as indicated above.

F4 *fimbriae* delivery in the simulated intestinal medium

The F4 *fimbriae* formulated with CM-HAS (tablets) were placed individually in SGF for 1 h and then transferred in SIF containing pancreatin [3] for 5 h at 37 °C (50 rpm). Samples were taken after every hour in SIF. The *fimbriae* delivery was determined on each sample.

Results and discussion

CM-HAS, with a substitution degree of 11 CM groups/100 glucosidic units, was previously introduced as excipient for oral tablet formulation of *Escherichia coli* [2].

The free F4 fimbriae were partially degraded by incubation in SGF conditions at pH 1.2, and almost completely digested after 2 h in SGF. Gastric resistance of F4 fimbriae is a prerequisite for its antigenicity. Thus, it is necessary to protect the F4 fimbriae against gastric digestion to obtain efficient oral immunisation of the piglets and CM-HAS seems to be a good excipient for this formulation. The SDS-PAGE and western blotting tests showed that the CM-HAS polymeric excipient was able to protect the fimbriae against 120 min of acidic and enzymatic denaturation when formulated as tablets (Fig. 1a, b).

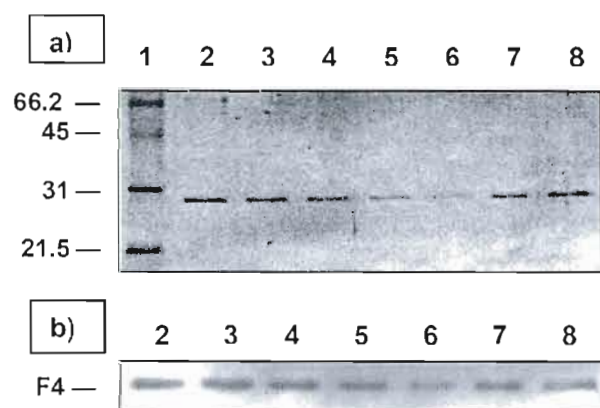


Fig. 1. Stability of F4 fimbriae in simulated gastric medium (SGF/USP): a) SDS-PAGE; b) Western Blotting. Molecular weight protein markers (kDa) (lane 1); free F4 (non-formulated) in PBS (0 min) (2) and after 30 min (3), 60 min (4), 90 min (5), 120 min (6) in SGF; F4 formulated with CM-HAS in PBS (0 min) (7) and after 120 min in SGF (8). n=2.

It was found that the presence of pancreatin in SIF does not affect the F4 fimbriae integrity after 5 h of SIF incubation (data not shown). Therefore, the formulated fimbriae liberated in SIF would retain their antigenicity (receptor binding activity). In the case of formulated fimbriae, the gel formed around the tablet did not really delay the liberation of fimbriae, which are rapidly liberated after 1 h in SIF (Fig. 2a, b). This liberation seems related to the swelling and erosion of the polymeric matrix. The gel layer thickness of the CM-HAS tablet first

increases by hydration and then decreases by erosion due to the tablet dissolution and also to alpha-amylase activity.

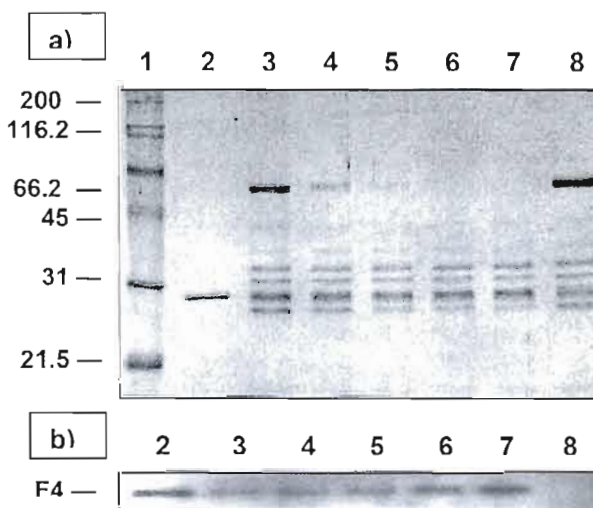


Fig. 2. Liberation of F4 fimbriae in simulated intestinal medium (SIF/USP): a) SDS-PAGE; b) Western Blotting. Molecular weight protein markers (kDa) (lane 1); F4 non-formulated in PBS (0 min) (2); F4 formulated with CM-HAS after 1 h in SGF and 1 h (3), 2 h (4), 3 h (5), 4 h (6), 5 h (7) in SIF; SIF (in the presence of pancreatin) (8). n=2.

Conclusion

The use of CM-HAS, which protects the F4 fimbriae against degradation by enzymes, could improve vaccination in neonatal and recently weaned pigs. The CM-HAS concept can open many and interesting perspectives for different oral therapeutic formulations.

References

- [1] W. Van den Broeck, E. Cox, B. M. Goddeeris, Induction of immune responses in pigs following oral administration of purified F4 fimbriae, Vaccine (1999) 17, 2020-2029.
- [2] C. Calinescu, J. Mulhbach, É. Nadeau, J. M. Fairbrother, M. A. Mateescu, Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipient for *Escherichia coli* oral formulations, Eur. J. Pharm. Biopharm. (2005) 60, 53-60.
- [3] U. S. Pharmacopeia National Formulary U.S.P. XXIV, NF XIX, United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD, 2000.

Acknowledgements

Support from VRQ (Valorisation Recherche Québec) as well as FQRNT graduate studentship granted to Carmen Calinescu are gratefully acknowledged.

Gastro-Resistant Oral Dosages Based on Carboxymethyl High Amylose Starch

Pompilia Ispas-Szabo, Carmen Calinescu,
and Mircea Alexandru Mateescu*

Department of Chemistry and Biochemistry, Université du Québec à Montréal,
CP 8888, Succ. A, Montréal (Québec) H3C 3P8, Canada.

* Corresponding author: mateescu.m-alexandru@uqam.ca

Summary

Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) is proposed as a novel excipient for oral solid delayed release dosages of pharmaceutical and nutraceutical agents. The pH-dependent properties allow gastro-protection of various active molecules (i.e. non-steroidal anti-inflammatory drugs, bacteria, etc.) in stomach acidity. The proposed excipient offers the advantage of solvent-free procedure.

Introduction

Current solutions to provide gastro-protection of oral solid dosage forms are mainly represented by the enteric coatings, usually methacrylate copolymers, applied from aqueous or organic/aqueous systems via a fluidized bed procedure. Such systems involve many preliminary trials in order to find optimal composition for the polymeric membrane, setting of coating parameters, etc. The wet coating procedure becomes critical and even not recommended for formulation of active agents sensitive to humidity or temperature or of biological active agents (i.e. bacteria, enzymes, peptides, etc.).

The CM-HAS was previously described as excipient and used for preparation of *Escherichia coli*¹ in monolithic tablet forms. Good microorganism viability was found after tablet incubation for 2 hours in simulated gastric fluid. Synthesized by HAS treatment with various amounts of monochloroacetic acid, the new excipient CM-HAS can be obtained at different substitution degrees. The number of carboxylic groups on the polymeric chains and the degree of

protonation are directly related to the tablets gastro-resistance and play the key role on the modulation of drug release.

Experimental methods

High amylose starch was derivatized by substitution of hydroxylic groups: carboxymethyl ionic functions were introduced by treatment of HAS in alkaline medium using a method previously described². The new derivative was characterized by its swelling properties and morphological aspects.

The capacity of CM-HAS to afford gastric protection of various active molecules was tested using i) monolithic and ii) dry coated tablets. For both series the tracers and tablets loading were identical (20%). The active agents assayed as tracers were Sodium Diclofenac, Acetyl salicylic acid, Acetaminophen and *L. Ramnosus*.

The monolithic tablets were obtained by one step direct compression of homogeneous mixtures at 2.3 T/cm² while for dry-coated tablets a preliminary compression of the cores was done followed by a second compression at 3 T/cm² providing the final tablets. The cores containing 100 mg of drug homogeneously mixed with 50 mg of CM-HAS were transferred into a larger die together with CM-HAS polymeric powder and compressed to obtain the final tablets of 500 mg. The gastric resistance of all tablets was tested for 2 hours in 900 mL simulated gastric fluid (SGF) at 37 °C using a USP apparatus II at 150 rpm followed by a period in simulated intestinal fluid (SIF). Drug release in both media was detected and quantified in UV at specific wavelength. Dry coated tablets containing the mentioned drugs were tested also in a USP apparatus I at 300 rpm.

In another series, 10 mg of lyophilized *L. rhamnosus* (10^9 bacteria), were formulated by direct compression at 2.5 T/cm^2 as monolithic (200 mg) and dry-coated (500 mg) tablets, based on CM-HAS. The formulations were incubated in 50 mL of sterile SGF (pH 1.2, with pepsin) for 1 h at 37°C (50 rpm) and then transferred into 50 mL of SIF containing pancreatin, incubated for 7 h (monolithic tablets) and, respectively, 24 h (coated tablets) at 37°C and 50 rpm. The viability of the released bacteria (number of colony forming units, CFU) was evaluated after 1 h in SGF and every hour in SIF during the first 12 h and then at 24 h in SIF; the colonies were counted after aerobic incubation at 37°C for at least 48 h.

Results and Discussion

Dry-coated tablets obtained with CM-HAS afford a complete gastric protection for all active molecules tested in the present study (Fig 1-2).

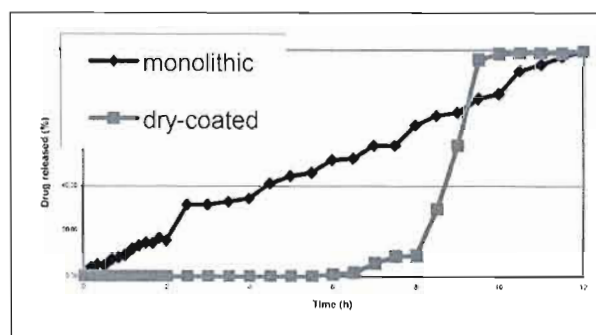


Figure 1: Dissolution profiles for Acetaminophen tablets based on CM-HAS: 2hs in SGF and 10h SIF using a USP apparatus II, at 150 rpm.

Monolithic tablets were able to control the release in acidic media for tested drugs while in the case of bacteria the release in SGF is practically delayed. These properties are related to the carboxylic groups introduced on the carbohydrate chains; $-\text{COOH}$ function is protonated in acidic medium and become ionized at pH higher than 5. Changing of the proton with cations induces a high swelling of the polymer³.

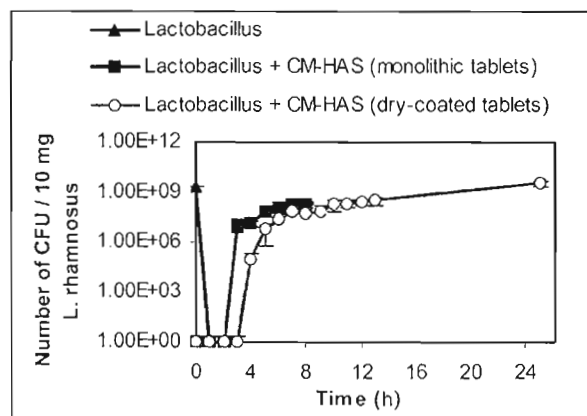


Figure 2: Release of live *Lactobacillus rhamnosus* bacteria formulated with CM-HAS in SGF and SIF compared with free bacteria. (n= 2).

Conclusion

The proposed approach represents an alternative for wet coating procedure and consists in tablets obtained by direct compression of dry powders of the polymeric excipient and selected drugs.

The swelling behavior of ionizable cross-linked high amylose starch derivatives is related to the nature of the side groups and also to the polymeric network organization. These data are useful in the design and development of controlled drug devices that come in contact with gastric and intestinal fluids.

Selective references

1. C. Calinescu, J. Mulhbach, E. Nadeau, JM Fairbrother, M. A. Mateescu. Eur J Pharm Biopharm. 2005, 60, 53-60.
2. J. Mulhbach, P. Ispas-Szabo, V. Lenaerts, M.A. Mateescu. J. Control. Rel, 2001, 76, 51-58.
3. J. Mulhbach, P. Ispas-Szabo, M.A. Mateescu. Int. J. Pharm., 2004, 278, 231-238.

Acknowledgements

Thanks are due to Dr A. Richard and Valeo Inc for interest and support and to F. Byette and P. de Koning for their technical assistance.

Carboxymethyl High Amylose Starch – Chitosan Tablets Affording Colon Probiotic Delivery

Carmen Calinescu and Mircea-Alexandru Mateescu*

Department of Chemistry and Centre BioMed, Université du Québec à Montréal, Montreal (Québec) H3C 3P8, Canada

* Corresponding author: mateescu.m-alexandru@uqam.ca

Abstract

Chitosan in association with Carboxymethyl High Amylose Starch (CM-HAS) excipient (monolithic tablets) delayed *Lactobacillus rhamnosus* probiotic delivery in simulated intestinal conditions in function of chitosan molecular weight. CM-HAS dry-coating of the tablets afforded a better bacteria viability in simulated gastric media and improved liberation times in simulated intestinal fluid.

Introduction

In order to provide nutritional and therapeutic health benefits, probiotics have to survive following the gastro-intestinal passage and to establish themselves in an adequate number in the intestine. Gastric acidity represents an important factor in reducing viability of bacteria before they reach the intestine. Therefore, oral formulations based on polymers (matrices) are often provided with an enteric coating in order to protect the bioactive agent from the acidic/gastric media and to deliver it to the intestinal site. CM-HAS was successfully used as excipient for oral tablet formulation of bacteria, ensuring gastro-protection without enteric coating [1]. Polymeric carboxylated (salt) carriers are expected to change the cation for a proton in an acidic media, resulting in a compact structure of the tablet. This ensures local surface surroundings buffering properties and thus protects the active agent against acidic denaturation. In neutral or weak alkaline media, the protonated form will change the proton for cations, facilitating the water uptake and generating the swelling and dissolution of matrix with total release of the bioactive agent. An important advantage of chitosan for its successful use in colon targeting consists in its stability in the low intestinal tract followed by a certain degradation by colonic bacterial enzymes [2]. However, a serious limitation of chitosan use is its rapid dissolution in the gastric medium. In this context, the association of CM-HAS with chitosan in tablet formulations [3] is expected to ensure a good viability of bacteria in gastric conditions (due to the presence of CM-HAS)

and to delay the bacteria liberation in SIF (due to the presence of chitosan). The objective of this study was to investigate the effect of CM-HAS – Chitosan excipients association on the survival in an acidic medium of *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) probiotic. The effect of the chitosan molecular weight (monolithic dosage forms with and without dry-coating) on the delaying bacteria delivery in simulated intestinal conditions was also investigated.

Experimental methods

Synthesis of CM-HAS

The starch derivative was synthesized as previously described [1]. The degree of substitution was determined by $^1\text{H-NMR}$ (Nuclear Magnetic Resonance) in deuterated dimethyl- d_6 sulphoxide.

Viability of bacteria in the acidic medium

Monolithic tablets (200 mg) based on chitosan (different molecular weights) and CM-HAS (different ratios) and containing lyophilized *L. rhamnosus* bacteria, were formulated by direct compression of dry powders at 2.5 T/cm^2 . Tablets were placed individually in 50 mL of Simulated Gastric Fluid containing pepsin (SGF, pH 1.2) for 1h - 2h at 37°C and 50 rpm. Then, the tablets were transferred into 50 mL of PBS (pH 7.4), crushed and homogenized.

Bacteria delivery in the intestinal medium

Monolithic tablets (200 mg) based on chitosan and CM-HAS (different ratios) and dry-coated tablets (500 mg: core tablet of 200 mg double-face coated with CM-HAS), both containing lyophilized *L. rhamnosus*, were incubated in 50 mL of SGF (pH 1.2) for 1h and then transferred into 50 mL of Simulated Intestinal Fluid containing pancreatin (SIF, pH 6.8) and incubated for 12h at 37°C and 50 rpm. Samples were taken after 1h in SGF and at every hour in the SIF over the first 12h to evaluate the viability of the liberated bacteria from the tablets.

The aliquots removed were serially diluted in order to determine the number of bacteria colony forming units (CFU) by culture on MRS nutrient agar plates at 37 °C for 48 h.

Results and discussion

Formulations based on CM-HAS and chitosan (tablets) significantly improved the survival of acid-sensitive *L. rhamnosus* in SGF as compared with free, non-protected bacteria (data not shown).

In the case of monolithic tablets, an increase in CM-HAS percentage afforded a better hydration of the tablets and delivery of a higher amount of living bacteria. Contrary, in the case of tablets based on chitosan only or on high chitosan percentages, there was a delay of bacteria liberation in function of molecular weight of chitosan (Fig. 1a, Table I), probably because of the gel formed in acidic conditions.

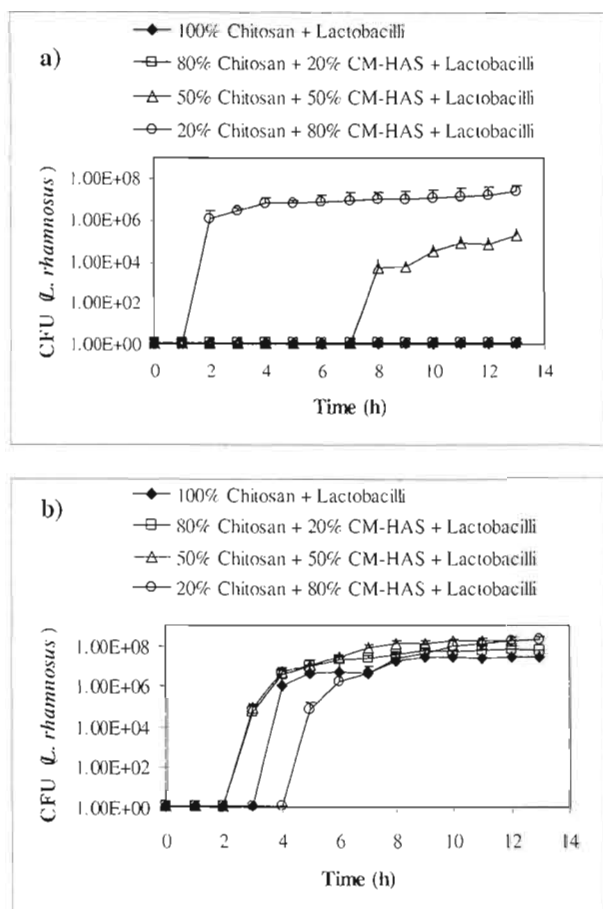


Fig.1. Liberation of living *Lactobacillus rhamnosus* formulated in tablets with CM-HAS and Chitosan (640 cps) following incubation in gastric and intestinal medium: a) monolithic and b) CM-HAS dry-coated tablets (n=3).

The CM-HAS dry-coating of monolithic tablets generated an advanced change in the effect of chitosan molecular weight on bacterial liberation and improved the viability of delivered bacteria in simulated intestinal conditions (Fig. 1b, Table I).

Table I. Modulation of bacteria liberation by different molecular weights of chitosan

| Formulations | Monolithic tablets | | | |
|----------------------|---------------------------|----|----|----|
| Chitosan (%) Type | 100 | 80 | 50 | 20 |
| 102 cps | - | 4h | 3h | 2h |
| 640 cps | - | - | 8h | 2h |
| 1700 cps | - | - | - | 2h |
| Formulations | CM-HAS dry-coated tablets | | | |
| Chitosan (%) Type | 100 | 80 | 50 | 20 |
| 102 cps | 3h | 3h | 5h | 5h |
| 640 cps | 4h | 3h | 3h | 5h |
| 1700 cps | 2h | 3h | 3h | 4h |

Tablets based on different ratios of Chitosan (different molecular weights) and CM-HAS (DS=0.25) were incubated 1h in SGF (pH 1.2) and 12h in SIF (pH 6.8) at 37 °C and 50 rpm. (-) means no bacteria liberation after 1h SGF and 12h SIF.

Conclusion

Chitosan association with CM-HAS can modulate the CM-HAS excipient properties, delaying bacteria liberation (monolithic tablets). In parallel, the CM-HAS dry-coating of monolithic tablets assured a better viability and liberation of bacteria in simulated intestinal conditions.

References

- [1] C. Calinescu, J. Mulhbach, É. Nadeau, J. M. Fairbrother, M. A. Mateescu, Eur. J. Pharm. Biopharm. (2005) 60, 53-60.
- [2] H. Tozaki, J. Komoike, C. Tada, T. Maruyama, A. Terabe, T. Suzuki, A. Yamamoto, S. Muranishi, J. Pharm. Sci. (1997) 86, 1016-1021.
- [3] M. Leonida, M. A. Mateescu, Transactions 33rd Int. Symp. on Controlled Release of Bioactive Materials, Vienna (2006), # 827a.

Acknowledgements

The Canada graduate studentship from NSERC granted to Carmen Calinescu is gratefully acknowledged. Thanks are due to Dr Francine Mondou (Harmonium International Inc., Canada) for generous supply of the *Lactobacillus rhamnosus*.

Novel Carboxymethyl Starch Excipients for Oral Dosage Forms

Pompilia Ispas Szabo, Patrick De Koninck, Carmen Calinescu
and Mircea Alexandru Mateescu*

Department of Chemistry & Biochemistry and BioMed Center, Université du Québec à Montréal,
CP 8888, Succ. A, Montréal (Québec) H3C 3P8, Canada.

* Corresponding author: mateescu.m-alexandru@uqam.ca

Summary

Starch treatment with monochloroacetate generated Carboxymethyl derivatives which can be obtained as sodium or protonated forms by controlling the final pH of washing media. The protonated carboxymethyl derivative exhibited better gastro-resistance compared to its sodium salt and both excipients afforded total gastric protection of drugs when formulated as dry-coated dosages.

Introduction

Compared to current practice based on enteric coatings applied via fluidized bed procedure, the novel Carboxymethyl Starch (CMS) derivatives offer a simpler and solvent-free alternative to get an increased gastro-protection of oral solid formulations.

The CMS was previously described as excipient and used for formulation of small molecules as well as microorganisms (*Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus*) in monolithic¹ or dry-coated gastro-resistant tablets². The carboxylic groups give an enhanced gastric stability and higher hydration, swelling or erosion in intestinal medium, modulating thus the delivery of drug. This study presents pharmaceutical characteristics of CMS excipients obtained in protonated CM(H)S and sodium CM(Na)S salt forms.

Experimental methods

Different substitution degrees were obtained by treatment of High Amylose Starch (Hylon VII, National Starch, USA) with various amounts of monochloroacetic acid^{1,2}.

For the same substitution degree, CM(H)S and CM(Na)S powders could be obtained by alternative precipitations and pH media adjustments, followed by washing and drying.

The novel excipients were characterized by FT-IR, potentiometric titration, swelling properties (data not shown) and dissolution profiles with and without digestive enzymes.

The capacity of CM(H)S and CM(Na)S to afford gastric protection of various active molecules (i.e. non-steroidal anti-inflammatory and antipyretic drugs) was tested with i) monolithic and ii) dry-coated tablets. For both series, tablets of 500 mg were obtained with 20% tracers (Sodium Diclofenac, Acetyl salicylic acid and Acetaminophen).

The monolithic tablets were obtained by one step direct compression (2.3 T/cm^2) of homogeneous mixtures of active agent and excipients powders, while for dry-coated tablets two compressions steps were required (first 150 mg core compression followed by a second compression with CMS at 3 T/cm^2). The gastric resistance of tablets was tested using a USP apparatus II at 100 rpm, for 2 h in 900 mL pepsin-free simulated gastric fluid (SGF) at 37°C followed by a period in simulated intestinal fluid (SIF). Drug release in both media was determined in UV at specific wavelengths. All formulations were tested in parallel in SGF and in SIF containing pancreatin (USP 28 method).

Results and Discussion

Dry-coated tablets based on CM(H)S afford a complete gastric protection for all tested active molecules. In the case of monolithic tablets based on the two mentioned polymeric forms, a limited release in acidic media was found, whereas in the case of dry-coated tablets, the release in SGF was

practically delayed. The mechanism of drug release is related to the carboxyl group protonation: in the gastric acidity the carboxyl side groups are protonated. In SIF, the change of protons with sodium cations induces a high swelling, erosion and drug dissolution³.

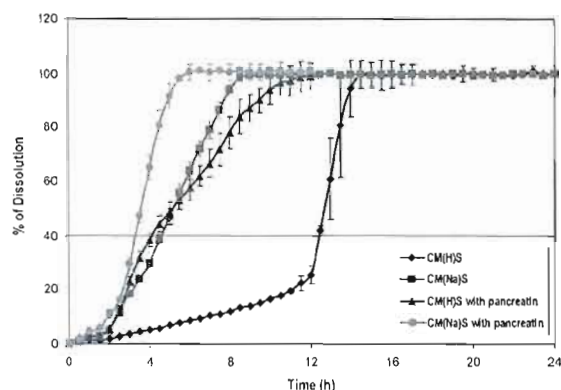


Figure 1: Dissolution profiles for Diclofenac monolithic tablets based on CM(H)S and CM(Na)S maintained 2h in SGF followed by SIF using a USP apparatus II, at 100 rpm (with and without pancreatin).

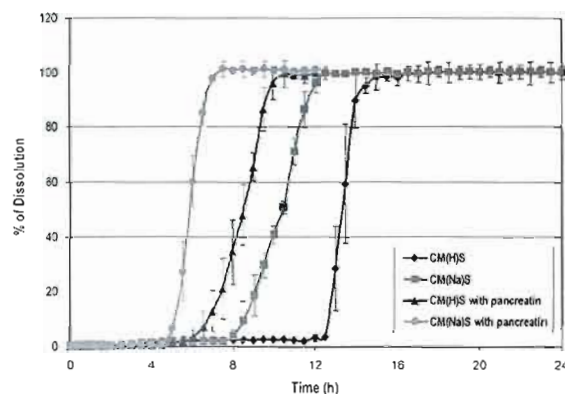


Figure 2: Dissolution profiles for Diclofenac dry-coated tablets based on CM(H)S and CM(Na)S maintained 2h in SGF followed by SIF using a USP apparatus II, at 100 rpm (with and without pancreatin).

Both excipients (sodium and protonated) afforded gastro-protection and ensured a delayed drug delivery up to 4-5 h, even in the presence of digestive enzymes in the dissolution media.

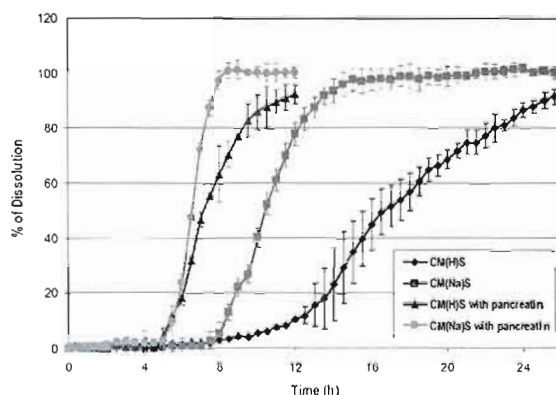


Figure 3: Acetyl Salicylic acid release from dry-coated tablets based on CM(H)S and CM(Na)S maintained 2h in SGF followed by SIF using a USP apparatus II, at 100 rpm (with and without pancreatin).

Conclusion

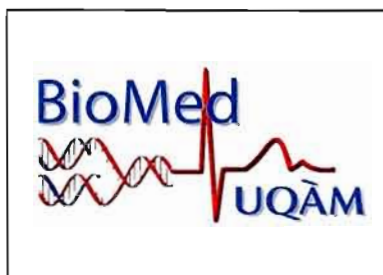
The presence of ionic groups on the Carboxymethyl Starch chains has a major impact on polymer swelling/erosion, controlling the mechanism of drugs release. The formulation with the proposed CMS excipients represents an alternative for wet coating procedure. Not only a manufacturing step is eliminated, but tablets obtained by direct compression of dry CMS powders and selected drugs, will not be exposed to risky solvents.

Acknowledgements

Thanks are due to Dr A. Richard and Valeo Inc for support and interest in this project.

Selective references

1. C. Calinescu, J. Mulhbachter, E. Nadeau, JM Fairbrother, M. A. Mateescu. Eur J Pharm Biopharm. 2005, 60, 53-60.
2. P. Ispas-Szabo, C. Calinescu, M.A. Mateescu. Transactions, 2006, # 853
3. J. Mulhbachter, P. Ispas-Szabo, M.A. Mateescu. Int. J. Pharm., 2004, 278, 231-238.



Le carboxyméthyl amidon comme excipient pour la formulation et le transport des *fimbriae* F4 au niveau du tractus gastro-intestinal

Carmen Calinescu¹, Jérôme Mulhbachher¹, Éric Nadeau², John Fairbrother²,
Mircea-Alexandru Mateescu¹

¹ Département de Chimie et Centre Biomed, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8

² Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7 C6

La capacité des *fimbriae* F4 de stimuler le système immunitaire présente une grande importance pour le développement des vaccins oraux contre les infections avec *Escherichia coli* chez le porc. Ces vaccins de nature protéique, administrés par la voie orale, sont peu stables dans les fluides du tractus gastro-intestinal. Dans ces conditions, il y a toujours la nécessité de développer des systèmes de transport appropriés qui vont assurer une bonne stabilité gastrique des *fimbriae* F4 et qui vont être capables de les relarguer à l'endroit désiré, au niveau de l'intestin grêle. Nous avons montré que le carboxyméthyl amidon (CM-A, avec un degré de substitution de 11 groupes fonctionnels / 100 unités glucosidiques) peut jouer un rôle important en ce qui concerne la protection des polypeptides F4 dans des conditions qui simulent le milieu de l'estomac (pepsine, pH 1,2). Les *fimbriae* F4 non-formulées (libres) ont été dégradées partiellement après 30–60 minutes d'incubation dans des conditions d'acidité gastrique, tandis que pour les périodes de temps plus longues (120 minutes), elles ont été dégradées presque complètement. La présence du CM-A a assuré une bonne stabilité et intégrité des *fimbriae* F4 même pour une période de 120 minutes dans les conditions gastriques. Pour ce qui est le milieu qui simule les conditions intestinales, les *fimbriae* F4 non-formulées ont présenté une bonne stabilité pour une période de 5 heures. Cette résistance des *fimbriae* à la digestion enzymatique est essentielle pour garder leur antigénicité. Ainsi, dans le milieu intestinal, au fur et à mesure que les *fimbriae* F4 (formulées avec le CM-A) sont libérées de la matrice polymérique, elles garderont leur stabilité et antigénicité. Le CM-A peut être considéré comme étant un excipient permettant la réalisation d'un système matriciel qui assure une bonne protection gastrique des agents bioactifs et leur livraison au niveau des sites spécifiques du tractus gastro-intestinal.

Colloque BioMed, Centre de recherches biomédicales, UQAM, Montréal, 2006.

Polymères biocompatibles comme excipients pour la formulation et le transport des bactéries lactiques au niveau du tractus gastro-intestinal

Calinescu C. et Mateescu M. A.

*Département de Chimie et Centre BioMed, Université du Québec à Montréal,
Québec, Canada, H3C 3P8*

Pour la majorité des agents thérapeutiques administrés par la voie orale, il y a le besoin que l'agent bioactif soit livré après un certain temps et à un site spécifique d'absorption au niveau de l'intestin. L'association du carboxyméthyl amidon (CM-A) avec les polymères présentant des charges positives (i.e. chitosane) permettra l'amélioration des propriétés polymériques de transporteur des agents bioactifs, en retardant le site de livraison (l'intestin grêle, le colon). Le projet propose la livraison des bactéries lactiques *Lactobacillus rhamnosus* à des différents sites intestinaux en utilisant les matrices mentionnées. Dans ce contexte, nous avons modifié les polymères à base d'amidon par substitution avec des fonctions acides de type carboxyméthyle. Ces polymères de CM-A ont été associés avec des chitosanes de différentes masses moléculaires. Les deux excipients associés ont été utilisés pour la formulation des bactéries lactiques (*Lactobacillus rhamnosus*). Les formulations sous forme de comprimés étaient obtenues par compression directe du mélange des poudres de l'agent bioactif avec les deux matériaux polymériques. Les tests de viabilité bactérienne ont montré que les formulations à base de CM-A:Chitosane, testés sous forme de comprimés, ont été capables d'assurer une bonne protection bactérienne contre la dénaturation acide, contrairement aux bactéries non-protégées pour lesquelles aucune viabilité bactérienne n'a été obtenue. Les profils de libération des bactéries sont bien corrélés avec les comportements différents de ces deux polymères dans le milieu acide de l'estomac et, respectivement, dans le milieu neutre intestinal.

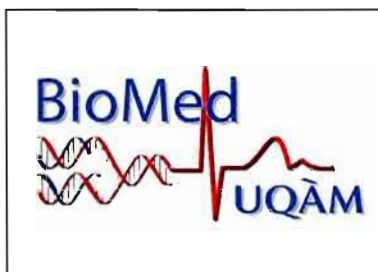
Carboxyméthyl amidon comme excipient pour le transport et la libération des bactéries d'*Escherichia coli* et des *fimbriae* F4 au niveau du tractus gastro-intestinal

Calinescu C.*[#], Nadeau É.**[#], Mulhbach J.*[#], Fairbrother J. M.**[#] et Mateescu M. A.*[#]

* Département de Chimie et Centre BioMed, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada; ** Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada; [#] Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP).

Les espèces pathogènes d'*Escherichia coli* sont généralement responsables d'infections intestinales se manifestant par des diarrhées chez les porcelets nouveau-nés ou plus âgés, qu'ils soient sevrés ou non. L'adhésion des bactéries aux cellules de la muqueuse intestinale peut être réalisée par des *fimbriae* – des structures protéiques qui se trouvent à la surface des bactéries et qui ont un rôle important dans la pathogenèse. En tant qu'élément principal dans le processus d'adhésion des bactéries aux cellules de l'épithélium intestinal, les *fimbriae* sont des candidates pour un vaccin sous-unitaire qui pourrait être utilisé pour prévenir la diarrhée post-sevrage chez le porc. Le problème central de l'administration orale des agents bioactifs est représenté par le milieu particulièrement agressif au niveau du système digestif. La majorité des principes bioactifs sont inactivés ou détruits par l'acidité gastrique et/ou par les enzymes du système gastro-intestinal. Par conséquent, il y a un besoin de développer des systèmes de transport et relargage de ces agents bioactifs. Cette étude *in vitro* a été dédiée à la mise au point d'un probiotique bactérien à base d'*Escherichia coli* et d'un vaccin sous-unitaire à base des *fimbriae* F4 contre la diarrhée post-sevrage chez le porc, les deux administrés par la voie orale. Le carboxyméthyl amidon riche en amylose (CMA) a été proposé comme un nouvel excipient pour la formulation de ces agents bioactifs sous forme de comprimés pour l'administration orale. Ces formulations ont protégé les agents bioactifs contre l'acidité gastrique et la dégradation des enzymes et ont assuré leur libération au niveau des milieux qui simulent les conditions intestinales. Trois variantes de CMA, avec des différents degrés de substitution, ont été synthétisées en traitant l'amidon avec des différentes quantités d'acide monochloroacétique. Les produits ont été séchés sous forme de poudre et des comprimés ont été obtenus par compression directe du mélange des poudres de l'excipient polymérique (CMA) et des bactéries *Escherichia coli* ou *fimbriae* F4 lyophilisées. Les comprimés à base de CMA ont resté compacts dans le milieu gastrique et ont assuré une bonne protection des agents bioactifs contre l'acidité gastrique même après deux heures de traitement. Le processus de libération des bactéries ou des *fimbriae* F4 a été basé sur l'hydratation, le gonflement et la dissolution de la matrice. De plus, une érosion enzymatique par l'alpha-amylase a accéléré le relargage de l'actif dans le milieu qui simulait les conditions intestinales. Les tests de viabilité bactérienne et de stabilité des *fimbriae* F4 ont montré que les variantes de

CMA, testées sous forme de comprimés, ont été capables d'assurer une très bonne protection des bactéries *Escherichia coli* / *fimbriae* F4 contre la dénaturation acide / enzymatique, contrairement aux comprimés d'amidon non-substitué ou aux agents bioactifs non-protégés. En plus, nous avons montré que les *fimbriae* F4 non-formulées ont présenté une bonne stabilité dans le milieu intestinal pour une période de cinq heures. Le CMA pourrait être considéré comme étant un possible système matriciel qui assure un bon transport des agents bioactifs (*Escherichia coli*, *fimbriae* F4) au niveau du tractus gastro-intestinal. Des études *in vivo* seront réalisées pour tester l'efficacité d'une formulation des *fimbriae* F4 à base de CMA dans le processus d'induction des anticorps spécifiques (IgM et IgA) au niveau du jéjunum et d'iléum des porcelets sevrés.



**Polymères biocompatibles pour le transport et la livraison des bactéries lactiques
Lactobacillus rhamnosus au niveau du tractus gastro-intestinal**

Carmen Calinescu et Mircea-Alexandru Mateescu

Département de Chimie et Centre BioMed, Université du Québec à Montréal
Québec, Canada, H3C 3P8

Depuis des années, des macromolécules d'origine biologique (polysaccharides, protéines), ainsi que des polymères synthétiques (polyvinyl pyrrolidone, polyvinyl alcool) sont utilisées pour des applications biomédicales. Parmi ces macromolécules, le chitosane d'origine marine, obtenu par la désacétylation partielle de la chitine, présente un intérêt majeur dû à son caractère cationique. Il a récemment été associé avec les polyanions naturels comme le carboxyméthyl cellulose, l'alginate, le dextrane sulfaté, le carrageenane, le sulfate de chondroïtine, le hyaluronate, etc. Dans cette étude, nous proposons une nouvelle matrice polymérique obtenue par l'association du chitosane avec le carboxyméthyl amidon non-réticulé (CMA) pour le transport et la livraison d'un probiotique bactérien *Lactobacillus rhamnosus*. L'hypothèse est que ce complexe pourrait être particulièrement utile assurant la gastro-résistance et la libération des bactéries dans des conditions qui simulent le milieu du tractus digestif. Il est connu que les probiotiques (bactéries commensales du système gastro-intestinal) ont un rôle bénéfique sur la santé de l'organisme. Pour exercer ces effets, les probiotiques doivent survivre dans le tractus gastro-intestinal et arriver en nombre suffisant au niveau intestinal. Ainsi, l'association du CMA (qui protège les agents bioactifs dans le milieu gastrique, acide) avec le chitosane (insoluble dans le milieu intestinal) permet l'amélioration des propriétés du CMA comme transporteur des agents bioactifs, en retardant leur livraison. Plusieurs formulations de *CMA-Chitosane* (différentes masses moléculaires) ont été réalisées en utilisant les bactéries lactiques *Lactobacillus rhamnosus*. L'ajout du chitosane dans ces formulations monolithiques a augmenté la stabilité des comprimés pour des durées de plus de 12 heures dans les milieux qui simulent les conditions gastro-entériques. Le chitosane a assuré un retard variable du processus de libération des bactéries lactiques en fonction du pourcentage et de la masse moléculaire du chitosane utilisé. Les formulations avec des plus grands pourcentages de CMA ont libéré des quantités plus élevées de bactéries.

Colloque BioMed, Centre de recherches biomédicales, UQAM, Montréal, 2007.

Détermination de l'effet des adjuvants CpG et toxine choléra sur la réponse immunitaire contre les *fimbriae* F4 administrées oralement chez le porc

* Delisle B., * J. M. Fairbrother, ** C. Calinescu, ** M. A. Mateescu et * É. Nadeau

*Laboratoire de référence EcL, Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Qc, Canada.

** Département chimie et biochimie, Université du Québec à Montréal, Qc, Canada.

Les infections aux *Escherichia coli* entérotoxigène (ETEC) positif au *fimbriae* F4 causent notamment chez le porc la diarrhée post-sevrage (DPS), une maladie caractérisée par une diarrhée aqueuse, des pertes de croissance et de la mortalité dans les 2 premières semaines suivant le sevrage, engendrant des pertes économiques importantes. Le *fimbriae* F4 est une structure protéique immunogène responsable de l'adhésion de la bactérie aux intestins, faisant de lui un bon candidat pour un vaccin sous-unitaire oral. L'objectif de cette étude est d'évaluer la réponse humorale anti-F4 stimulée par l'administration orale de *fimbriae* F4 supplémentés de différents adjuvants. Pour ce faire, des porcelets sevrés et positifs pour le récepteur intestinal spécifique au *fimbriae* F4 ont été immunisés oralement avec du *fimbriae* F4 semi-purifiés uniquement ou du *fimbriae* F4 supplémentés de la toxine choléra complète ou d'un ADN CpG spécifique à l'espèce porcine (CpG D19), deux adjuvants immuno-stimulateurs. Chacune des formulations vaccinales a été incorporée dans un système de livraison macroscopique composé de carboxyméthyl amidon (CM-A). Des porcs recevant que le CM-A uniquement ont de plus été utilisés comme groupe contrôle. Des échantillons de sangs et de fèces ont été récoltés à différents intervalles post-vaccination ainsi que des contenus intestinaux à la nécropsie. Les réponses humorales des IgM et des IgA anti-F4 ont été analysées par ELISA. Nous avons d'abord observé une production légèrement plus élevée, mais non statistiquement significative, d'IgM sérique anti-F4 à environ 10 jours après la dernière vaccination pour les groupes vaccinés en comparaison avec le groupe non vacciné. La production d'IgA sérique anti-F4 était négligeable dans tous les groupes. La moyenne géométrique des titres d'IgM anti-F4 mucosaux des porcs vaccinés avec la formulation comprenant le CpG était près de 2 fois supérieure ($P < 0,05$) à celui du groupe vacciné avec le *fimbriae* F4 uniquement, tandis que la moyenne géométrique des titres des porcs vaccinés avec la formulation comprenant la toxine choléra était environ de 4 fois inférieure ($P < 0,001$) à celui du groupe vacciné avec du *fimbriae* F4 uniquement. Tel que observé pour le sang, la production d'IgA mucosaux était négligeable pour tous les groupes. En conclusion, le CpG D19, mais non la toxine choléra, démontre un effet d'adjuvant mucosal lorsque administré oralement chez le porc nouvellement sevré. Ainsi, la formulation vaccinale contenant du *fimbriae* F4 supplémenté de CpG D19 serait le meilleur candidat pour stimuler la réponse humorale intestinale anti-F4 chez le porc.

1^{er} Symposium du Centre de recherche en infectiologie porcine (CRIP), Saint-Hyacinthe. Présentation orale, 2007.

**Polymères biocompatibles pour le transport et la livraison des bactéries lactiques
Lactobacillus rhamnosus au niveau du tractus gastro-intestinal**

Carmen Calinescu et Mircea-Alexandru Mateescu

*Département de Chimie et Centre BioMed, Université du Québec à Montréal
Québec, Canada, H3C 3P8*

Parmi les macromolécules d'origine biologique, le chitosane d'origine marine, obtenu par la désacétylation partielle de la chitine, présente un intérêt majeur dû à son caractère cationique. Il a récemment été associé avec les polyanions naturels comme le carboxyméthyl cellulose, l'alginate, le dextrane sulfaté, le sulfate de chondroïtine, le hyaluronate, etc. Dans cette étude, nous proposons une nouvelle matrice polymérique obtenue par l'association du chitosane avec le carboxyméthyl amidon non-réticulé (CMA) pour le transport et la livraison d'un probiotique bactérien *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*). Ainsi, l'association du CMA (qui assure une certaine protection des agents bioactifs dans le milieu gastrique, acide) avec le chitosane (insoluble dans le milieu intestinal) permet l'amélioration des propriétés du CMA comme transporteur des agents bioactifs, en retardant leur livraison dans les conditions intestinales. Plusieurs formulations de CMA:Chitosane (différentes masses moléculaires) ont été réalisées en utilisant les bactéries lactiques *L. rhamnosus*. L'ajout du chitosane dans ces formulations monolithiques a augmenté la stabilité des comprimés pour des durées de plus de 12 heures dans les milieux qui simulent les conditions gastro-entériques. Le chitosane a assuré un retard variable du processus de libération des bactéries lactiques en fonction du pourcentage et de la masse moléculaire du chitosane utilisés. Plus le pourcentage et la masse moléculaire du chitosane ont diminué dans les formulations monolithiques, plus il y a eu une libération des bactéries lactiques viables. La présence du double-noyau de CMA a modifié l'effet de la masse moléculaire du chitosane dans le processus de libération des bactéries.

Polymères biocompatibles pour le transport et la livraison des bactéries lactiques au niveau du tractus gastro-intestinal

Carmen Calinescu et Mircea Alexandru Mateescu*

*Département de Chimie, Université du Québec à Montréal
C.P. 8888, Succ. A, Montréal, Qc, H3C 3P8
*mateescu.m-alexandru@uqam.ca*

Une nouvelle matrice monolithique hydrophilique basée sur une stabilisation ionique entre un excipient anionique (carboxyméthyl amidon riche en amylose, CMA) et un excipient cationique (Chitosane) a été proposée pour la livraison des probiotiques au niveau du côlon. Le CMA assure la gastro-protection des probiotiques et le Chitosane prévient leur libération rapide. L'augmentation du pourcentage et de la masse moléculaire (MM) du Chitosane a généré un retard et une diminution de la quantité des bactéries (*Lactobacillus rhamnosus*) libérées. La libération des bactéries a été contrôlée par le gonflement des comprimés (dû au Chitosane), suivi par l'érosion et la dissolution du CM-HAS. La barrière de gel de Chitosane formée dans les conditions acides a aussi retardé la libération des bactéries. Le double-noyau à base de CM-HAS a contribué à l'augmentation du pourcentage des bactéries libérées dans les conditions qui simulent le milieu intestinal.

Demande de brevet

Oral enzyme formulations for intestinal delivery

Inventors: Mircea Alexandru Mateescu¹, Carmen Calinescu¹, Pompilia Ispas-Szabo¹,
Bruno Mondovi², Rodolfo Federico³

¹ *Department of Chemistry and Centre Pharmaqam, Université du Québec à Montréal,
CP 8888, Succ. A, Montréal (Québec) H3C 3P8, Canada*

² *Department of Biochemical Sciences "Rossi-Fanelli",
University of Rome "La Sapienza", 00185 Rome, Italy*

³ *Department of Biology, 3rd University of Rome, 00146 Rome, Italy*

The present invention is proposing oral enzyme formulations containing a vegetal extract of diamine oxidase (VDAO) and catalase (Cat), used individually or associated. The anti-inflammatory DAO associated to catalase (clearing the pro-oxidant hydrogen peroxide) and formulated with selected excipients could constitute a therapy for treatment of intestinal diseases. Oral dosage forms can be obtained by direct compression of active dry powders with selected excipients: *i.e.* cellulose derivatives, metacrylates, chitosan, carboxymethyl starch (CMS), or their mixture. The protective effect is dependent on gel-like structure formed after exposure to simulated gastric fluid and on proteins loading. The proposed association acting as anti-histaminic, anti-inflammatory and anti-oxidant is recommended to treat inflammatory bowel diseases (ulcerative colitis and Crohn's disease).

BIBLIOGRAPHIE

Agostinelli E. et Seiler N. 2006. «Non-irradiation-derived reactive oxygen species (ROS) and cancer: therapeutic implications». *Amino Acids*, vol. 31, p. 341-355.

Akbuga J. 1993. «Use of chitosonium malate as a matrix in sustained-release tablets». *Int. J. Pharm.*, vol. 89, p. 19-24.

Allen A. 1978. «Structure of gastrointestinal mucus glycoproteins and the viscous and gel-forming properties of mucus». *Br. Med. Bull.*, vol. 34, p. 28-33.

Appela M. C., Gonzalez S. N., Nader de Macias M. E., Romeo N. et Olivier G. 1992. «*In vitro* studies on the inhibition of the growth of *Shigella sonnei* by *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus acidophilus*». *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 73, p. 480-483.

Arriaga Y. L., Harville B. A. et Dreyfus L. A. 1995. «Contribution of individual disulfide bonds to biological action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B». *Infect. Immun.*, vol. 63, p. 4715-4720.

Artursson P., Lindmark T., Davis S. S. et Illum L. 1994. «Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2)». *Pharm. Res.*, vol. 11, p. 1358-1361.

Atanasiu R. L., Stea D., Mateescu M. A., Vergely C., Dalloz F., Maupoil V., Nadeau R. et Rochette L. 1998. «Direct evidence of ceruloplasmin free radicals scavenging properties». *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 189, p. 127-135.

Atreya R., Mudter J., Finotto S., Mullberg J., Jostock T., Wirtz S., Schutz M., Bartsch B., Holtmann M., Becker C., Strand D., Czaja J., Schlaak J. F., Lehr H. A., Autschbach F., Schurmann G., Nishimoto N., Yoshizaki K., Ito H., Kishimoto T., Galle P. R., Rose-John S. et Neurath M. F. 2000. «Blockade of interleukin 6 *trans* signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn's disease and experimental colitis *in vivo*». *Nat. Med.*, vol. 6, p. 583-588.

Averill-Bates D. A., Agostinelli D., Przybytkowski E., Mateescu M.A. et Mondovi B. 1993. «Cytotoxicity and kinetic analysis of purified serum amine oxidase in the presence of spermine in chinese hamster ovary cells». *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 300, p. 75-79.

Bakker D., Willemsen P. T., Simon L. H., van Zijderveld F. G. et de Graaf F. K. 1992a. «Characterization of the antigenic and adhesive properties of FaeG, the major subunit of K88 *fimbriae*». *Mol. Microbiol.*, vol. 6, p. 247-255.

- Bakker D., Willemsen P. T., Willems R. H., Huisman T. T., Mooi F. R., Oudega B., Stegehuis F. et de Graaf F. K. 1992b. «Identification of minor fimbrial subunits involved in biosynthesis of K88 fimbriae». *J. Bacteriol.*, vol. 174, p. 6350-6458.
- Basit A. et Bloor J. 2003. «Perspectives on colonic drug delivery». *Drug Delivery*. Business briefing: Pharmatech.
- Bellelli A., Finazzi-Agro A., Floris G. et Brunori M. 1991. «On the mechanism and rate of substrate oxidation by amine oxidase from lentil seedlings». *J. Biol. Chem.*, vol. 266, p. 20654-20657.
- BeMiller J. N. 1973. «Starch amylose». In *Industrial gums. Polysaccharides and their derivatives*. 2nd edition, (Whistler R. L., ed.), p. 545-566. New York: Academic Press Inc.
- Berger J., Reist M., Mayer J. M., Felt O., Peppas N. A. et Gurny R. 2004. «Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 57, p. 19-34.
- Bernabé P., Peniche C. et Arguelles-Monal W. 2005. «Swelling behaviour of chitosan/pectin polyelectrolyte complex membranes. Effect of thermal cross-linking». *Polym. Bull.*, vol. 55, p. 367-375.
- Bhatt P. P. 2004. «Osmotic drug delivery systems for poorly soluble drugs». *The drug delivery companies report autumn / winter*. Pharma Ventures Ltd.
- Bianchi A. T. J., Scholten J. W., Van Zijderveld A. M., Van Zijderveld F. G. et Bokhout B. A. 1996. «Parenteral vaccination of mice and piglets with F4⁺ *Escherichia coli* suppresses the enteric anti-F4 response upon oral infection». *Vaccine*, vol. 14, p. 199-206.
- Bibiloni R., Fedorak R. N., Tannock G. W., Madsen K. L., Gionchetti P., Campieri M., De Simone C. et Sartor R. B. 2005. «VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis». *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 100, p. 1539-1546.
- Billey L. O., Erickson A. K. et Francis D. H. 1998. «Multiple receptors on porcine intestinal epithelial cells for the three variants of *Escherichia coli* K88 fimbrial adhesin». *Vet. Microbiol.*, vol. 59, p. 203-212.
- Boér K., Darvas Zs., Bösze Sz., Schwelberger H., Baki M., Bélai F., Pal Zs. et Falus A. 2004. «Histamine metabolism and CD8(+) T cell infiltration in colon adenomas». *Inflamm. Res.*, vol. 53, p. S83-S84.

- Bomba A., Nemcova R., Gancarcikova S., Herich R., Guba P. et Mudronova D. 2002. «Improvement of the probiotic effect of microorganisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids». *Br. J. Nutr.*, vol. 88, p. S95-S99.
- Bouché N. et Fromm H. 2004. «GABA in plants: just a metabolite?». *Trends Plant Sci.*, vol. 9, p. 110-115.
- Brazeau B. J., Johnson B. J. et Wilmot C. M. 2004. «Copper-containing amine oxidases. Biogenesis and catalysis; a structural perspective». *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 428, p. 22-31.
- Brondsted H., Andersen C. et Hovgaard L. 1998. «Cross linked dextran – a new capsule material for colon targeting of drug». *J. Control. Rel.*, vol. 53, p. 7-13.
- Brooksbank B. W. L. et Balazs R. 1984. «Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and lipoperoxidation in Down's syndrome fetal brain». *Brain Res.*, vol. 318, p. 37-44.
- Brown D. D., Tomchick R. et Axelrod J. 1959. «The distribution and properties of a histamine-methylating enzyme». *J. Biol. Chem.*, vol. 234, p. 2948-2950 (*cité par Maintz et Novak, 2007*).
- Bursova Z. et Magner E. 2009. «Kinetics of oxidation of hydrogen peroxide at hemin-modified electrodes in nonaqueous solvents». *Bioelectrochemistry*, vol. 76, p. 63-69.
- Cai D. et Klinman J. P. 1994. «Evidence of a self-catalytic mechanism of 2,4,5-trihydroxyphenylalanine quinine biogenesis in yeast copper amine oxidase». *J. Biol. Chem.*, vol. 269, p. 32039-32042.
- Caillard R., Petit A. et Subirade M. 2009. «Design and evaluation of succinylated soy protein tablets as delayed drug delivery systems». *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 45, p. 414-420.
- Calinescu C., Mulhbachter J., Nadeau É., Fairbrother J. M. et Mateescu M. A. 2005. «Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipient for *Escherichia coli* oral formulations». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 60, p. 53-60.
- Calinescu C., Nadeau É., Mulhbachter J., Fairbrother J. M. et Mateescu M. A. 2007. «Carboxymethyl high amylose starch for F4 *fimbriae* gastro-resistant oral formulation». *Int. J. Pharm.*, vol. 343, p. 18-25.

- Calinescu C. et Mateescu M. A. 2008. «Carboxymethyl high amylose starch: Chitosan self-stabilized matrix for probiotic colon delivery». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 70, p. 582-589.
- Calinescu C., Federico R., Mondovi B. et Mateescu M. A. 2010. «Zymographic assay of plant diamine oxidase on entrapped peroxidase polyacrylamide gel electrophoresis. A study of stability to proteolysis». *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 396, p. 1281-1290.
- Calinescu C., Mondovi B., Federico R. et Mateescu M. A. «Carboxymethyl starch:Chitosan monolithic matrices containing diamine oxidase and catalase for intestinal delivery». *Soumis*.
- Cartilier L., Mateescu M. A., Dumoulin Y. et Lenaerts V. 1994. «Cross-linked amylose as a binder/disintegrant in tablets». International Patent PCT/CA94/00163.
- Chan R. P., Pope D. J., Gilbett A. P., Snetta P. J., Baron J. H. et Bennard Jones J. F. 1983. «Studies of two novel sulphasalazine analogs ipsalazide and balsalazide». *Dig. Dis. Sci.*, vol. 28, p. 609-716.
- Chellat F., Tabrizian M., Dumitriu S., Chornet E., Magny P., Rivard C. H. et Yahia L. 2000. «*In vitro* and *in vivo* biocompatibility of chitosan-xanthan polyionic complex». *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 51, p. 107-116.
- Chen S. C., Wu Y. C., Mi F. L., Lin Y. H., Yu L. C. et Sung H. W. 2004. «A novel pH-sensitive hydrogel composed of *N,O*-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery». *J. Control. Rel.*, vol. 96, p. 285-300.
- Chen W. B., Wang L. F., Chen J. S. et Fan S. Y. 2005. «Characterization of polyelectrolyte complexes between chondroitin sulfate and chitosan in the solid state». *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 75, p. 128-137.
- Chen L. et Subirade M. 2009. «Elaboration and characterization of soy/zein protein microspheres for controlled nutreaceutical delivery». *Biomacromolecules*, vol. 14, p. 3327-3334.
- Chiu H. C., Hsiue G. H., Lee Y. P. et Huang L. W. 1999. «Synthesis and characterization of pH-sensitive dextran hydrogels as a potential colon-specific drug delivery system». *J. Biomater. Sci., Polymer Edition*, vol. 10, p. 591-608.
- Chourasia M. K. et Jain S. K. 2003. «Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems». *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, vol. 6, p. 33-66.

- Chung Y. C., Wang H. L., Chen Y. M. et Li S. L. 2003. «Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens». *Bioresour. Technol.*, vol. 88, p. 179-184.
- Collins M. D. et Gibson G. R. 1999. «Probiotics, prebiotics and symbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut». *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 69, p. S1052-1057.
- Cona A., Rea G., Angelini R., Federico R. et Tavladoraki P. 2006. «Functions of amine oxidases in plant development and defence». *Trends Plant Sci.*, vol. 11, p. 80-88.
- Cox E. et Houvenaghel A. 1993. «Comparison of the *in vitro* adhesion of K88, K99, F41 and P987 positive *Escherichia coli* to intestinal villi of 4- to 5-week-old pigs». *Vet. Microbiol.*, vol. 34, p. 7-18.
- Dale H. D. et Laidlaw P. D. 1910. «The physiological action of β -iminazolyéthylamine». *J. Physiol.*, vol. 41, p. 318-344 (*cité par* Maintz et Novak, 2007).
- Deacon M. P., McGurk S., Roberts C. J., Williams P. M., Tendler S. J., Davies M. C., Davis S. S. et Harding S. E. 2000. «Atomic force microscopy of gastric mucin and chitosan mucoadhesive systems». *Biochem. J.*, vol. 348, p. 557-563.
- De Aizpurua H. J. et Russell-Jones G. J. 1988. «Oral vaccination. Identification of classes of proteins that provoke an immune response upon oral feeding». *J. Exp. Med.*, vol. 167, p. 440-451.
- Denuziere A., Ferrier D. et Domard A. 1996. «Chitosan – chondroitin sulfate and chitosan – hyaluronate polyelectrolyte complexes. Physico-chemical aspects». *Carbohydr. Polym.*, vol. 29, p. 317-323.
- Deprez P., Van Den Hende C., Muylle E. et Oyaert W. 1986. «The influence of the administration of sow's milk on the postweaning excretion of haemolytic *Escherichia coli* in the pig». *Vet. Res. Commun.*, vol. 10, p. 469-478.
- Désévaux C., Dubreuil P. et Lenaerts V. 2002. «Characterization of cross-linked high amylose starch matrix implants». *J. Control. Rel.*, vol. 82, p. 83-93.
- Dodane V., Amin K. M. et Merwin J. R. 1999. «Effect of chitosan on epithelial permeability and structure». *Int. J. Pharm.*, vol. 182, p. 21-32.
- Duchmann R. et Zeitz M. 1999. «Crohn's disease». In *Mucosal immunology* (Ogra P. L. *et al.*, eds), p. 1055-1080. San Diego: Academic Press.

Dumoulin M. J., Chahine R., Atanasiu R, Nadeau R. et Mateescu M. A. 1996. «Comparative cardioprotective and antioxidant properties of ceruloplasmin, superoxide dismutase and bovine serum albumin». *Arzneim. Forsch./Drug Res.*, vol. 46, p. 855-861.

Dubreuil, J. D. 1997. «*Escherichia coli* STb enterotoxin». *Microbiology*, vol. 143, p. 1783-1795.

Duff A. P., Cohen A. E., Ellis P. J., Kuchar J. A., Langlley D. B., Shepard E. M., Dooley D. M., Freeman H. C. et Guss J. M. 2003. «The crystal structure of *Pichia pastoris* lysyl oxidase». *Biochemistry*, vol. 42, p. 15148-15157.

Duguid J. P., Smith I. W. et Edmunds P. N. 1955. «Non-flagellar filamentous appendages (*fimbriae*) and hemagglutinating activity in *Bacterium coli*». *J. Pathol. Bacteriol.*, vol. 70, p. 335-348 (cité par Van den Broeck *et al.*, 2000).

Dumitriu S., Magny P., Montane D., Vidal P. F. et Chornet E. 1994. «Polyionic hydrogels obtained by complexation between xanthan and chitosan : their properties as supports for enzyme immobilization». *J. Bioact. Compat. Polym.*, vol. 9, p. 184-209.

Dumoulin Y., Clément P., Mateescu M. A. et Cartilier L. H. 1994. «Cross-linked amylose as a new binder/disintegrant in compressed tablets». *S. T. P. Pharma Sciences*, vol. 4, p. 329-335.

Dumoulin Y., Alex S., Szabo P., Cartilier L. et Mateescu M.A. 1998. «Cross-linked amylose as matrix for drug controlled release. X-ray and FT-IR structural analysis». *Carbohydr. Polym.*, vol. 37, p. 361-370.

Dumoulin Y., Cartilier L. H. et Mateescu M. A. 1999. «Cross-linked amylose tablets containing α -amylase: an enzymatically-controlled drug release system». *J. Control. Rel.*, vol. 60, p. 161-167.

Englyst H. N., Hay S. et MacFarlane G. T. 1987. «Polysaccharide breakdown by mixed populations of human faecal bacteria». *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 45, p. 163-171.

Erickson A. K., Willgohe J. A., McFarland S. Y., Benfield D. A. et Francis D. H. 1992. «Identification of two porcine brush border glycoproteins that bind the K88ac adhesin of *Escherichia coli* and correlation of these glycoproteins with the adhesive phenotype». *Infect. Immun.*, vol. 60, p. 983-988.

Evans D. F., Pye G., Bramley R., Clark A. G., Dyson T. J. et Hardcastle J. D. 1988. «Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects». *Gut*, vol. 29, p. 1035-1041.

- Fairbrother J. M., Nadeau E. et Gyles C. L. 2005. «*Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies». *Anim. Health Res. Rev.*, vol. 6, p. 17-39.
- Fairbrother J. M. et Gyles C. L. 2006. «*Escherichia coli* infections». In *Disease of swine* (Straw B. E., D'Allaire S., Zimmerman J. E. et Taylor D. J., eds), p. 639-674. Iowa State University Press.
- Federico R., Befani O., Mondovi B., Mulhbach J. et Mateescu M. A. 2000. «Immobilization of plant histaminase for medical applications». *Inflamm. Res.*, vol. 49, p. S60-S61.
- Federico R., Cona A., Caliceti P. et Veronese F. M. 2006. «Histaminase PEGylation: Preparation and characterization of a new bioconjugate for therapeutic application». *J. Control. Rel.*, vol. 115, p. 168-174.
- Felt O., Furrer P., Mayer J. M., Plazonnet B., Buri P. et Gurny R. 1999. «Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention». *Int. J. Pharm.*, vol. 180, p. 185-193.
- Fieldes M. A. 1992. «Using Coomassie Blue to stabilize H₂O₂ guaiacol stained peroxidases on polyacrylamide gels». *Electrophoresis*, vol. 13, p. 454-455.
- Fiocchi C. 1998. «Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis». *Gastroenterology*, vol. 115, p. 182-205.
- Fleisher D., Li C., Zhou Y., Pao L.-H. et Karim A. 1999. «Drug, meal, and formulation interactions influencing drug absorption after oral administration». *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 36, p. 233-254.
- Fogel W. A., Lewinski A. et Jochem J. 2005. «Histamine in idiopathic inflammatory bowel diseases – not a standby player». *Folia Medica Cracoviensia* XLVI, p. 107-118 (citée par Fogel, Toporowska-Kowalska et Stasiak, 2009).
- Fogel W. A. et Lewinski A. 2006. «The effects of diamine oxidase administration on experimental ulcerative colitis in rats». *Inflamm. Res.*, vol. 55, p. S1-S2.
- Fogel W. A., Toporowska-Kowalska E. et Stasiak A. 2009. «Copper amine oxidases in intestine diseases». In *Copper Amine Oxidases: Structures, Catalytic Mechanisms and Role in Pathophysiology*. (Floris G. et Mondovi B., eds), p. 159-176. CRC Press.
- Foster J. F. 1965. «Physical properties of amylose and amylopectin in solution». In *Starch: chemistry and technology; fundamental aspects*, (Paschall E. F. et Whistler R. L., eds.), p. 349-391. New York: Academic Press Inc.

- French D. 1984. «Organisation of starch granules». In *Starch, chemistry and technology*, 2nd edition, (Whistler R. L., BeMiller J. N. et Paschall E. F., eds.), p. 184-247. Orlando: Academic Press Inc.
- Friend D. R. 2005. «New oral delivery systems for treatment of inflammatory bowel disease». *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, p. 247-265.
- Furrie E., Macfarlane S., Kennedy A., Cummings J. H., Walsh S. V., O'Neil D. A. et Macfarlane G. T. 2005. «Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum* / Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial». *Gut*, vol. 54, p. 242-249.
- Fukuda H. 1980. «Polyelectrolyte complexes of chitosan with sodium carboxymethylcellulose». *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, vol. 53, p. 837-840.
- Gaastera W., Mooi F. R., Stuitje A. R. et de Graaf F. K. 1981. «The nucleotide sequence of the gene encoding the K88ab protein subunit of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*». *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 12, p. 41-46.
- Gardner A. M., Xu F. H., Fady C., Jacoby F. J., Duffey D. C., Tu Y. et Lichtenstein A. 1997. «Apoptotic vs. nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide». *Free Radical Biol. Med.*, vol. 22, p. 73-83.
- Gaserod O., Smidsrod O. et Skjak-Braek G. 1998. «Microcapsules of alginate-chitosan – I. A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan». *Biomaterials*, vol. 19, p. 1815-1825.
- Gebicka L. 1999. «Kinetic approach to the interaction of sodium *n*-dodecyl sulphate with heme enzymes». *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 24, p. 69-74.
- Gidley M. J. 1989. «Molecular mechanisms underlying amylose aggregation and gelation». *Macromolecules*, vol. 22, p. 351-358.
- Gil G., Del Monaco S., Cerrutti P. et Galvagno M. 2004. «Selective antimicrobial activity of chitosan on beer spoilage bacteria and brewing yeasts». *Biotechnol. Lett.*, vol. 26, p. 569-574.
- Gliko-Kabir I., Yagen B., Baluom M. et Rubinstein A. 2000. «Phosphated crosslinked guar for colon-specific drug delivery. II. *In vitro* and *in vivo* evaluation in the rat». *J. Control. Rel.*, vol. 63, p. 129-134.
- Goldin B. R. et Gorbach S. L. 1980. «Effect of *Lactobacillus acidophilus* dietary supplements on 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced intestinal cancer in rats». *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 64, p. 263-265.

- Gorbach S. L. 1971. «Intestinal flora». *Gastroenterology*, vol. 60, p. 1110-1129.
- Goth L. et Eaton J. W. 2000. «Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes». *Lancet*, vol. 356, p. 1820-1821.
- Grange P. A. et Mouricout M. A. 1996. «Transferrin associated with the porcine intestinal mucosa is a receptor specific for K88ab *fimbriae* of *Escherichia coli*». *Infect. Immun.*, vol 64, p. 606-610.
- Guarner F. et Schaafsma G. I. 1998. «Probiotics». *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 39, p. 237-238.
- Guarner F. et Malagelada J. R. 2003. «Gut flora in health and disease». *The Lancet*, vol. 361, p. 512-519.
- Guss J. M., Zanotti G. et Salminen T. A. 2009. «Copper amine oxidase crystal structures». In *Copper amine oxidases. Structures, catalytic mechanisms, and role in pathophysiology*, (Floris G. et Mondovi B., eds), p. 119-142, CRC Press.
- Hampson D. J. 1994. «Postweaning *Escherichia coli* diarrhea in pigs». In *Escherichia coli in domestic animals and humans*, (Gyles C. L., ed), p. 177, CAB International.
- Hanauer S. B. 2006. «Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities». *Infl. Bowel Dis.*, vol. 12, p. S3-S9.
- He P., Davis S. S. et Illum L. 1998. «*In vitro* evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres». *Int. J. Pharm.*, vol. 166, p. 75-88.
- Hebden J. M., Wilson C. G., Spiller R. C., Gilchrist P. J., Blackshaw E., Frier M. E. et Perkins A. C. 1999. «Regional differences in quinine absorption from the undisturbed human colon assessed using a timed release delivery system». *Pharm. Res.*, vol. 16, p. 1087-1092.
- Heby O. 1989. «Polyamines and cell differentiation». In *The physiology of polyamines* (Bachrach U. et Heimer Y. M., eds). p. 83-94, Boca Raton: CRC Press.
- Helander I. M., Nurmiäho-Lassila E. L., Ahvenainen R., Rhoades J. et Roller S. 2001. «Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria». *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 71, p. 235-244.
- Heller J., Baker R. W., Gale R. M. et Rodin J. O. 1978. «Controlled drug release by polymer dissolution. I. Partial esters of maleic anhydride copolymers – properties and theory». *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 22, p. 1991-2009.

- Heller J. 1980. «Controlled release of biologically active compounds from bioerodible polymers». *Biomaterials*, vol. 1, p. 51-57.
- Hesterberg R., Kusche J., Stahlknecht C. D. et Feussner K. D. 1981. «The start of a programme for measuring diamine oxidase activity in biopsy specimens of human rectal mucosa». *Agents and Actions*, vol. 11, p. 33-37.
- Hidalgo I. J., Raub T. J. et Borchardt R. T. 1989. «Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability». *Gastroenterology*, vol. 96, p. 736-749.
- Hirano S., Seino H., Akiyama Y. et Nonaka I. 1990. «Chitosan: a biocompatible material for oral and intravenous administrations». In *Progress in Biomedical Polymers* (Gebelein C. G. et Dunn R. L., eds), p. 283-290. New York: Plenum Press.
- Hoekstra A., Struszczyk H. et Kivekas O. 1998. «Percutaneous microcrystalline chitosan application for sealing arterial puncture sites». *Biomaterials*, vol. 19, p. 1467-1471.
- Hopkins M. J., Sharp R. et Macfarlane G. T. 2002. «Variation in human intestinal microbiota with age». *Dig. Liver Dis.*, vol. 34, p. S12-S18.
- Hou W. M., Miyazaki S., Takada M. et Komai T. 1985. «Sustained release of indomethacin from chitosan granules». *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 33, p. 3986-3992.
- Houen, G. et Leonardsen, L. 1992. «A specific peroxidase-coupled activity stain for diamine oxidases». *Anal. Biochem.*, vol. 204, p. 296-299.
- Hsieh D. S. T. 1988. «Controlled release systems: past, present, and future». In *Controlled release systems: fabrication technology*. vol. 1, p. 1-16. New York: CRC Press Inc.
- Huffnagle G. B. et Noverr M. C. 2008. «GI microbiota and regulation of the immune system». New York: Springer Science.
- Huyghebaert N., Snoeck V., Vermeire A., Cox E., Goddeeris B. M. et Remon J. P. 2005. «Development of an enteric-coated pellet formulation of F4 *fimbriae* for oral vaccination of suckling piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli* infections». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 59, p. 273-281.
- Iida R., Yasuda T., Nadano D. et Kishi K. 1990. «Intensification of peroxidase-diaminobenzidine staining using gold-sulfide-silver: a rapid and highly sensitive method for visualization in immunoblotting». *Electrophoresis*, vol. 11, p. 852-855.

Isaacs K. L., Sartor R. B. et Haskill S. 1992. «Cytokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase chain reaction amplification». *Gastroenterology*, vol. 103, p. 1587-1595.

Ispas-Szabo P., Ravenelle F., Hassan I., Preda M. et Mateescu M.A. 2000. «Structure-properties relationship in cross-linked high amylose starch for use in controlled drug release». *Carbohydr. Res.*, vol. 323, p. 163-175.

Jacobs A. A. C., Roosendaal B., Van Breeman J. F. L. et de Graaf F. K. 1987. «Role of phenylalanine-150 in the receptor binding domain of the K88 fibrillar subunit». *J. Bacteriol.*, vol. 169, p. 4907-4911.

Jane J. L., Shen J. J., Radosavljevic M., Kasemsuwan T., Xu A. et Seib P. A. 1993. «Internal structure of starch granules». In *Carbohydrates and carbohydrate polymers. Analysis, biotechnology, modification. Antiviral, biomedical and other applications*, (Yalpani M., ed.), p. 174-184. ATL Press Inc.

Janeway C. A., Travers P., Walport M. et Shlomchik M. J. 2005. «Innate immunity. Immunobiology», p. 37-100. New York: Garland Science Publishing.

Kaila M., Isolauri E., Soppi E., Virtanen E., Laine S. et Arvilommi H. 1992. «Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human lactobacillus strain». *Pediatr. Res.*, vol. 32, p. 141-144.

Kawashima Y., Lin S. Y., Kasai A., Handa T. et Takenaka H. 1985. «Preparation of a prolonged release tablet of aspirin with chitosan». *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 33, p. 2107-2113.

Kim Y. M., Lee J. C., Choi Y. J. et Yang H. C. 1985. «Studies on production of β -galactosidase by *Lactobacillus sporogenes*. Properties and applications [hydrolysis of lactose in milk and milk products] of β -galactosidase». *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, vol. 13, p. 355-359.

Kinget R., Kalala W., Vervoort L. et Mooter G. U. 1998. «Colonic drug targeting». *J. Drug Targeting*, vol. 6, p. 129-149.

Klemm P. 1985. «Fimbrial adhesions of *Escherichia coli*». *Rev. Infect. Dis.*, vol. 3, p. 321-340.

Klinman J. P. et Mu D. 1994. «Quinoenzymes in biology». *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 63, p. 299-344.

Knapczyk J., Krowczynski L., Pawlik B. et Liber Z. 1989. «Pharmaceutical dosage forms with chitosan». In: *Chitin and chitosan, sources, chemistry, biochemistry*,

physical properties and applications, (Skjak-Braek G., Anthonsen T. et Sandford P., eds), p. 665-670. London: Elsevier Applied Science.

Knaul J. Z., Kasaai M. R., Bui V. T. et Creber K. A. M. 1998. «Characterization of deacetylated chitosan and chitosan molecular weight review». *Can. J. Chem.*, vol. 76, p. 1699-1706.

Korsmeyer R. W., Gurny R., Doelker E., Buri P. et Peppas N. A. 1983. «Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers». *Int. J. Pharm.*, vol. 15, p. 25-35.

Kost J. et Langer R. 1987. «Equilibrium swollen hydrogels in controlled release applications». In *Hydrogels in medicine and pharmacy, volume III. Properties and applications*, (Peppas N. A., ed.), p. 95-108. CRC Press Inc.

Krabbe A. A. et Olesen J. 1980. «Headache provocation by continuous intravenous infusion of histamine. Clinical results and receptor mechanisms». *Pain*, vol. 8, p. 253-259.

Kristl J., Smid-Korbar J., Struc E., Schara M. et Rupprecht H. 1993. «Hydrocolloids and gels of chitosan as drug carriers». *Int. J. Pharm.*, vol. 99, p. 13-19.

Krog N. 1971. «Amylose complexing effect of food grade emulsifiers». *Starch/Stärke*, vol. 23, p. 206-210.

Kruidenier L., Kuiper I., van Duijn W., Mieremet-Ooms M. A. C., van Hogeand R. A., Lamers C. B. H. W. et Verspaget H. W. 2003. «Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease». *J. Pathol.*, vol. 201, p. 17-27.

Kumar V., Dooley D. M., Freeman H. C., Guss J. M., Harvey I., McGuirl M. A., Wilce M. C. et Zubak V. M. 1996. «Crystal structure of an eukaryotic (pea seedling) copper-containing amine oxidase at 2.2 Å resolution». *Structure*, vol 4, p. 943-955.

Kumar M. N. V. 2000. «A review of chitin and chitosan applications». *React. Funct. Polym.*, vol. 46, p. 1-27.

Kusche J., Izbicke J. R., Mennigen R., Curt A. et Parkin J. V. 1986. «The effect of experimental carcinogenesis on intestinal diamine oxidase, a polyamine deaminating enzyme». *Cancer Detect. Prev.*, vol. 9, p. 17-29.

Kusche J., Mennigen R., Leisten L. et Krakamp B. 1988. «Large bowel tumor promotion by diamine oxidase inhibition: animal model and clinical aspects». *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 250, p. 747-752.

Laakso T., Arturson P. et Sjöholm I. 1986. «Biodegradable microspheres: factors affecting the distribution and degradation of polyacryl starch microparticles». *J. Pharm. Sci.*, vol. 75, p. 962-967.

Langer R. 1990. «Novel drug delivery systems». *Chemistry in Britain*, vol. 26, p. 232-236.

Langlois D. P. et Wagoner J. A. 1967. «Production and use of amylose». In *Starch: chemistry and technology*, Volume II, (Whistler R. L. et Paschal E. F., eds.), p. 451-497. New York: Academic Press Inc.

Leach H. W. 1965. «Gelatinization of starch». In *Starch: chemistry and technology; fundamental aspects*, (Paschall E. F. et Whistler R. L., eds.), p. 289-307. New York: Academic Press Inc.

Lee D. M., Friend D. S., Gurish M. F., Benoist C., Mathis D. et Brenner M. B. 2002. «Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis». *Science*, vol. 297, p. 1689-1692.

Lee M-H., Chuang M-T. et Hou W-C. 2002. «Activity staining of plasma amine oxidase after polyacrylamide gel electrophoresis and its application to natural inhibitor screening». *Electrophoresis*, vol. 23, p. 2369-2372.

Lelievre J., Lewis J. A. et Marsden K. 1986. «The size and shape of amylopectin: a study using analytical ultracentrifugation». *Carbohydr. Res.*, vol. 153, p. 195-203.

Lenaerts V., Dumoulin Y. et Mateescu M. A. 1991. «Controlled release of theophylline from cross-linked amylose tablets». *J. Control. Rel.*, vol. 15, p. 39-46.

Leopold C. S. et Eikeler D. 2000. «Basic coating polymers for the colon-specific drug delivery in inflammatory bowel disease». *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 26, p. 1239-1246.

Lessof M. H., Gant V., Hinuma K., Murphy G. M. et Dowling R. H. 1990. «Recurrent urticaria and reduced diamine oxidase activity». *Clin. Exp. Allergy*, vol. 20, p. 373-376.

Le Tien C., Lacroix M., Ispas-Szabo P. et Mateescu M. A. 2003. «N-acylated chitosan: hydrophobic matrices for controlled drug release». *J. Control. Rel.*, vol. 93, p. 1-13.

Li V. H. K., Robinson J. R. et Lee V. H. L. 1987. «Influence of drug properties and routes of drug administration on the design of sustained and controlled release systems». In *Controlled drug delivery: fundamentals and applications*, 2nd edition, (Robinson J. R. et Lee V. H. L., eds.), p. 3-94. New York: Marcel Dekker Inc.

- Li R., Klinman J. P. et Mathews F. S. 1998. «Copper amine oxidase from *Hansenula polymorpha*: the crystal structure determined at 2.4 Å resolution reveals the active conformation». *Structure*, vol. 6, p. 293-307.
- Liao I. C., Wan A. C. A., Yim E. K. F. et Leong K. W. 2005. «Controlled release from fibers of polyelectrolyte complexes». *J. Control. Rel.*, vol. 104, p. 347-358.
- Liu H., Yang X. G., Nie S. F., Wei L. L., Zhou L. L., Liu H., Tang R. et Pan W. S. 2007. «Chitosan-based controlled porosity osmotic pump for colon-specific delivery system : screening of formulation variables and *in vitro* investigation». *Int. J. Pharm.*, vol. 332, p. 115-124.
- Lobenberg R. et Amidon G. L. 2000. «Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 50, p. 3-12.
- Lorenzo-Lamosa M. L., Remunan-Lopez C., Vila-Jato J. L. et Alonson M. J. 1998. «Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery». *J. Control. Rel.*, vol. 52, p. 109-118.
- Lunelli M., Di Paolo M. L., Biadene M., Calderone V., Battistutta R., Scarpa M., Rigo A. et Zanotti G. 2005. «Crystal structure of amine oxidase from bovine serum». *J. Mol. Biol.*, vol. 346, p. 991-1004.
- MacLaughlin F. C., Mumper R. J., Wang J., Tagliaferri J. M., Gill I., Hinchcliffe M. et Rolland A. P. 1998. «Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for *in vivo* plasmid delivery». *J. Control. Rel.*, vol. 56, p. 259-272.
- Macleod G. S., Fell J. T., Collett J. H., Sharma H. L. et Smith A. M. 1999. «Selective drug delivery to the colon using pectin:chitosan:hydroxypropylmethyl cellulose film coated tablets». *Int. J. Pharm.*, vol. 187, p. 251-257.
- Mahida Y. R. et Rolfe V. E. 2004. «Host-bacterial interactions in inflammatory bowel disease». *Clin. Sci.*, vol. 107, p. 331-341.
- Maintz L., Benfadal S., Allam J. P., Hagemann T., Fimmers R. et Novak N. 2006. «Evidence for a reduced histamine degradation capacity in a subgroup of patients with atopic eczema». *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 117, p. 1106-1112.
- Maintz L. et Novak N. 2007. «Histamine and histamine intolerance». *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 85, p. 1185-1196.
- Mannrs D. J. 1985. In *New approaches to research on cereal carbohydrates*, (Hill R. D. et Munk L., eds.), p. 45-54. Amsterdam: Elsevier.

Mansueto P., Montalto G., Pacor M. L., Esposito-Pellitteri M., Ditta V., Lo Bianco C., Leto-Barone S. M. et Di Lorenzo G. 2006. «Food allergy in gastroenterologic diseases: review of literature». *World J. Gastroenterol.*, vol. 12, p. 7744-7752.

Marteau P. R., de Vrese M., Cellier C. J. et Schrezenmeir J. 2001. «Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics». *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 73, p. 430S-436S.

Masini E., Vannacci A., Marzocca C., Mannaioni P. F., Befani O., Federico R., Toma A. et Mondovi B. 2002. «A plant histaminase modulates cardiac anaphylactic response in guinea pig». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 296, p. 840-846.

Masini E., Pierpaoli S., Marzocca C., Mannaioni P. F., Pietrangeli P., Mateescu M. A., Zelli M., Federico R. et Mondovi B. 2003. «Protective effects of a plant histaminase in myocardial ischemia and reperfusion injury *in vivo*». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 309, p. 432-439.

Masini E., Vannacci A., Giannini L., Befani O., Nistri S., Mateescu M. A., Mannaioni P. F., Mondovi B. et Federico R. 2004. «Effect of a plant histaminase on asthmatic reaction induced by inhaled antigen in sensitized guinea pig». *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 502, p. 253-264.

Masini E., Fabbri V., Giannini L., Vannacci A., Messerini L., Perna F., Cortesini C. et Cianchi F. 2005. «Histamine and histidine decarboxylase up-regulation in colorectal cancer: correlation with tumor stage». *Inflamm. Res.*, vol. 54, p. S80-S81.

Masini E., Cuzzocrea S., Bani D., Mazzon E., Muja C., Mastroianni R., Fabrizi F., Pietrangeli P., Marcocci L., Mondovi B., Mannaioni P. F. et Federico R. 2007. «Beneficial effects of a plant histaminase in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion». *Shock*, vol. 27, p. 409-415.

Mateescu M. A. et Schell H. D. 1983. «A new amyloclastic method for the selective determination for α -amylase using cross-linked amylose as an insoluble substrate». *Carbohydr. Res.*, vol. 124, p. 319-323.

Mateescu M. A., Dumoulin Y., Cartilier L. et Lenaerts V. 1992. «Cross-linked polyhydroxylic material for enzymatically controlled drug release». International Patent PCT: W094/02121; US Patent 5,603,956.

Mateescu M. A., Befani O. et Mondovi B. 1993. «Immobilized concanavalin A decreases the stability at proteolysis of amineoxidases». In *Stability and stabilization of enzymes* (van den Tweel W. J. J., Harder A. et Buitelaar R. M., eds). p. 383-389, Elsevier Science Publishers.

- Mateescu M. A., Lenaerts V. et Dumoulin Y. 1994. «Cross-linked material for controlled release of biologically active compounds». Canadian Patent 2,041,774
- Mateescu M. A., Lenaerts V. et Dumoulin Y. 1995. «Cross-linked material for controlled release of biologically active compounds». US Patent 5,456,921.
- Mateescu M. A., Dumoulin M. J., Wang X. T., Nadeau R. et Mondovi B. 1997. «A new physiological role of copper amine oxidases: cardioprotection against reactive oxygen intermediates». *J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 48, p. 110-121.
- Mateescu M. A., Ispas-Szabo P. et Mulhbach J. 2006. «Cross-linked starch derivatives for highly loaded pharmaceutical formulations». In *Polysaccharides for drug delivery and pharmaceutical applications* (Marchessault R. H., Ravenelle F. et Zhu X. X., eds.), p. 121-137. Oxford University Press.
- Mateescu M. A. et Nadeau R. 2009. «Copper amine oxidases. Antioxidant and cardioprotective agents». In *Copper amine oxidases: structures, catalytic mechanisms, and role in pathophysiology* (Floris G. et Mondovi B., eds), p. 253-260. CRC.
- Mateescu M. A., Calinescu C., Le Tien C., Federico R. et Mondovi B. 2011. «Zymographic assay of oxidases using entrapped peroxidase or hemin polyacrylamide gel electrophoresis». In *Protein electrophoresis and detection: Methods and protocols* (Kurien B. T. et Scofield R. H., eds). Methods in molecular biology series, New York: Humana Press/Springer Science (*sous presse*).
- Matsuzaki T. 1998. «Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shiota». *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 41, p. 133-140.
- McGhee J. R., Mestecky J., Dertzbaugh M. T., Eldridge J. H., Hirasawa M. et Kiyono H. 1992. «The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development». *Vaccine*, vol. 10, p. 75-88.
- Medda R., Padiglia A. et Floris G. 1995. «Plant copper-amine oxidases». *Phytochemistry*, vol. 39, p. 1-9.
- Metcalf J. W., Krogfelt K. A., Krivan H. C., Cohen P. S. et Laux D. C. 1991. «Characterisation and identification of a porcine small intestine mucus receptor for the K88ab fimbrial adhesin». *Infect. Immun.*, vol 59, p. 91-96.
- Mi F. L., Her N. L., Kaun C. Y., Wong T. B. et Shyu S. S. 1997. «Chitosan tablets for controlled drug release of theophylline: effect of polymer - drug wet or dry blending and anionic - cationic interpolymer complex». *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 66, p. 2495-2505.

- Miyazaki S., Nakayama A., Oda M., Takada M. et Attwood D. 1995. «Drug release from oral mucosal adhesive tablets of chitosan and sodium alginate». *Int. J. Pharm.*, vol. 118, p. 257-263.
- Moller S. G., Urwin P. E., Atkinson H. J. et McPherson M. J. 1998. «Nematode-induced expression of *atao1*, a gene encoding an extracellular diamine oxidase associated with developing vascular tissue». *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, vol. 53, p. 73-79.
- Mondovi B., Rotilio G., Finazzi A. et Scioscia-Santoro A. 1964. «Purification of pig-kidney diamine oxidase and its identity with histaminase». *Biochem. J.*, vol. 91, p. 408-415.
- Mondovi B., Rotilio G., Finazzi-Agro A. et Costa M. T. 1967. «Diamine oxidase inactivation by hydrogen peroxide». *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 132, p. 521-523.
- Mondovi B. et Finazzi-Agro A. 1982. «Structure and fonction of amine oxidases». In *Structure and function relationships in biochemical systems*. (Bossa F., Chiancone E., Finazzi-Agro A. et Storm R., eds), p. 141-153. Plenum Publishing Corporation.
- Mondovi B., Gerosa P. et Cavaliere R. 1982. «Studies on the effects of polyamines and their products on Ehrlich ascites tumors». *Agents Actions*, vol. 12, p. 450-451.
- Mondovi B., Befani O. et Mateescu M. A. 1992. «Enhanced susceptibility to proteolysis of copper amineoxidases immobilized on ConA Sepharose». *Life Chemistry Reports*, vol. 10, p. 151-155.
- Mondovi B., Agostinelli E., Przybytkowski E., Mateescu M. A. et Averill-Bates D. 1994. «Amine oxidases as possible antineoplastic drugs». *Progr. Biotechnol.*, vol. 9, p. 775-778.
- Mondovi B., Wang X. T., Pietrangelli P., Wang R., Nadeau R. et Mateescu M. A. 1997. «New aspects on the physiological role of copper amineoxidases». *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 2, p. 31-43.
- Mondovi B., Befani O., Federico R., Mateescu M. A., Masini E., Mannaioni P. F. et Vannacci A. 2002. «Histaminase of vegetable origin for use in the treatment of allergic and septic shock and of allergic asthma». *Int Patent Publ No: WO 043745*.
- Mooi F. R. et de Graaf F. K. 1985. «Molecular biology of *fimbriae* of enterotoxigenic *Escherichia coli*». *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 118, p. 119-138.
- Moon H. W. et Bunn T. O. 1993. «Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals». *Vaccine*, vol. 11, p. 213-220.

- Morotomi M. et Mutai M. 1986. «*In vitro* binding of potent mutagenic pyrolysates to intestinal bacteria». *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 77, p. 195-201.
- Moussavi M. et Adams M. C. 2010. «An *in vitro* study on bacterial growth interactions and intestinal epithelial cell adhesion characteristics of probiotic combinations». *Curr. Microbiol.*, vol. 60, p. 327-335.
- Mulhbachter J., Ispas-Szabo P., Lenaerts V. et Mateescu M. A. 2001. «Cross-linked high amylose starch derivatives as matrices for controlled release of high drug loadings». *J. Control. Rel.*, vol. 76, p. 51-58.
- Mulhbachter J., Ispas-Szabo P. et Mateescu, M. A. 2004. «Modified high cross-linked high amylose starch derivatives for drug release. II. Swelling properties and mechanistic study». *Int. J. Pharm.*, vol. 278, p. 231-238.
- Mulhbachter J., Mateescu M. A. et Calinescu C. 2004. «Composition comprising polymeric material and uses thereof». Demande de brevet no. 60/542,299.
- Muraoka M., Hu Z., Shimokawa T., Sekino S., Kurogoshi R., Kuboi Y., Yoshikawa Y. et Takada K. 1998. «Evaluation of intestinal pressure-controlled colon delivery capsule containing caffeine as a model drug in human volunteers». *J. Control. Rel.*, vol. 52, p. 119-129.
- Muzzarelli R. A. A. 1977. «Stereochemistry and physical characterization». Chap. In *Chitin*, p. 45-86. New York: Pergamon Press.
- Muzzarelli R., Baldassarre V., Conto F., Ferrara P., Biagini G., Gazzanelli G. et Vasi V. 1988. «Biological activity of chitosan: ultrastructural study». *Biomaterials*, vol. 9, p. 247-252.
- Nakamura J., Kido M., Nishida K. et Sasaki H. 1992. «Hydrolysis of salicylic acid-tyrosine, salicylic acid-methionine prodrugs in rabbits». *Int. J. Pharm.*, vol. 87, p. 59-66.
- Nataro J. P. et Kaper J. B. 1998. «Diarrheagenic *Escherichia coli*». *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 11, p. 142-201.
- Néel J. 1965. *Exposés de chimie macromoléculaire: structure chimique des polyosides*. Paris: Gauthier-Villars, 167 p.
- Néel J. 1972. «Conformation des macromolécules». In *Chimie macromoléculaire*, volume II, (Champetier G., Buvet R., Néel J. et Sigwalt P., eds.), p. 395-597. Paris: Hermann.

- Neurath M. F., Finotto S. et Glimcher L. H. 2002. «The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity». *Nat. Med.*, vol. 8, p. 567-573.
- No H. K., Park N. Y., Lee S. H. et Meyers S. P. 2002. «Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights». *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 74, p. 65-72.
- Nwe N., Chandkrachang S., Stevens W. F., Maw T., Tan T. K., Khor E. et Wong S. M. 2002. «Production of fungal chitosan by solid state and submerged fermentation». *Carbohydr. Polym.*, vol. 49, p. 235-237.
- Nymalm Y., Kidron H., Soederholm A., Viitanen L., Kaukonen K., Pihlavisto M., Smith D., Veromaa T., Airenne T. T., Johnson M. S. et Salminen T. A. 2003. «Crystallization and preliminary X-ray analysis of human vascular adhesion protein-1». *Acta Crystallogr.*, vol. 59, p. 1288-1290.
- Oberle R. L. et Amidon G. L. 1987. «The influence of variable gastric emptying and intestinal transit rates on the plasma level curve of cimetidine; an explanation for the double peak phenomenon». *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, vol. 15, p. 529-544.
- Okamoto Y., Nose M., Miyatake K., Sekine J., Oura R., Shigemasa Y. et Minami S. 2001. «Physical changes of chitin and chitosan in canine gastrointestinal tract». *Carbohydr. Polym.*, vol. 44, p. 211-215.
- Osman N., Adawi D., Ahrne S., Jeppsson B. et Molin G. 2004. «Modulation of the effect of dextran sulfate sodium-induced acute colitis by the administration of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*». *Dig. Dis. Sci.*, vol. 49, p. 320-327.
- Oudega B., de Graaf M., De Boer L., Bakker D., Vader C. E. M., Mooi F. R. et de Graaf F. K. 1989. «Detection and identification of FaeC as a minor component of K88 fibrillae of *Escherichia coli*». *Mol. Microbiol.*, vol. 3, p. 645-652.
- Papadakis K. A. et Targan S. R. 2000. «Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease». *Annu. Rev. Med.*, vol. 51, p. 289-298.
- Parsons M. R., Convery M. A., Wilmot C. M., Yadav R. D. S., Blakeley V., Corner A. S., Phillips S. E., McPherson M. J. et Knowles P. F. 1995. «Crystal structure of a quinoenzyme: copper amine oxidase of *Escherichia coli* at 2 Å resolution». *Structure*, vol. 3, p. 1171-1184.
- Peppas N. A. 1985. «Analysis of fickian drug release from polymers». *Pharm. Acta Helv.*, vol. 60, p. 110-111.

- Peppas N. A. et Buri P. A. 1985. «Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues». *J. Control. Rel.*, vol. 2, p. 257-275.
- Picardo M., Grammatico P., Roccella F., Roccella M., Grandinetti M., Del Porto G. et Passi S. 1996. «Imbalance in the antioxidant pool in melanoma cells and normal melanocytes from patients with melanoma». *J. Invest. Dermatol.*, vol. 107, p. 322-326.
- Pietrangeli P., Nocera S., Fattibene P., Wang X. T., Mondovi B. et Morpurgo L. 2000. «Modulation of bovine serum amine oxidase activity by hydrogen peroxide». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 267, p. 174-178.
- Pietrangeli P., Nocera S., Mondovi B. et Morpurgo L. 2003. «Is the catalytic mechanism of bacteria, plant, and mammal copper-TPQ amine oxidases identical?». *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1647, p. 152-156.
- Pietrangeli P., Federico R., Mondovi B. et Morpurgo L. 2007. «Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases». *J. Inorg. Biochem.*, vol. 101, p. 997-1004.
- Podolsky D. K. 2002. «Inflammatory bowel disease». *N. Engl. J. Med.*, vol. 347, p. 417-429.
- Qaqish R. B. et Amiji M. M. 1999. «Synthesis of a fluorescent chitosan derivative and its application for the study of chitosan-mucin interactions». *Carbohydr. Polym.*, vol. 38, p. 99-107.
- Qin Y. et Agboh O. C. 1998. «Chitin and chitosan fibres». *Med. Device Technol.*, vol. 11, p. 24-28.
- Rafter J. J. 1995. «The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention». *Scand. J. Gastroenterol.*, vol. 30, p. 497-502.
- Raithel M., Matek M., Baenkler H. W., Jorde W. et Hahn E. G. 1995. «Mucosal histamine content and histamine secretion in Crohn's disease, ulcerative colitis and allergic enteropathy». *Int. Arch. Allergy Immunol.*, vol. 108, p. 127-133.
- Ranade V. V. et Hollinger M. A. 1996. «Oral drug delivery». In *Drug delivery systems*, p. 127-173. Boca Raton (Florida): CRC Press.
- Rao S. P. et Sharma C. P. 1997. «Use of chitosan as biomaterial. Studies on its safety and haemostatic potential». *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 34, p. 21-28.
- Ratnam V. D., Ankola D. D., Bhardwaj V., Sahana D. K. et Ravi Kumar M. N. V. 2006. «Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective». *J. Control. Rel.*, vol. 113, p. 189-207.

Ravin L. J., Baldinus J. G. et Mazur M. L. 1962. «Effect of sulfate content of several anionic polymers on *in vitro* activity of pepsine». *J. Pharm. Sci.*, vol. 51, p. 857-860 (cité par BeMiller, 1973).

Rea G., Metoui O., Infantino A., Federico R. et Angelini R. 2002. «Copper amine oxidase expression in defence responses to wounding and *Ascochyta rabiei* invasion». *Plant Physiol.*, vol. 128, p. 865-875.

Reddy S. N., Bazzocchi G., Chan S., Akashi K., Villanueva-Meyer J., Yanni G., Mena I. et Snape W. J. 1991. «Colonic motility and transit in health and ulcerative colitis». *Gastroenterology*, vol. 101, p. 1289-1297.

Reddy B. S. 1998. «Prevention of colon cancer by pre- and probiotics: evidence from laboratory studies». *Br. J. Nutr.*, vol. 80, p. S219-223.

Reid G., Bruce A. W., Fraser N., Heinemann C., Owen J. et Henning B. 2001. «Oral probiotics can resolve urogenital infections». *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 30, p. 49-52.

Reinecker H. C., Steffen M., Witthoeft T., Pflueger I., Schreiber S., MacDermott R. P. et Raedler A. 1993. «Enhanced secretion of tumor necrosis factor- α , IL-6, and IL-1 β by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease». *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 94, p. 174-181.

Rinaudo M., Pavlov G. et Desbrieres J. 1999. «Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan». *Polymer*, vol. 40, p. 7029-7032.

Ritschel W. A., Sabouni A., Gehrke S. H. et Hwang S. T. «Permeability of [^3H] water across a porous polymer matrix used as rate-limiting shell in compression-coated tablets». *J. Control. Rel.*, vol. 12, p. 97-102.

Risbud M. V., Hardikar A. A., Bhat S. V. et Bhonde R. R. 2000. «pH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release system for antibiotic delivery». *J. Control. Rel.*, vol. 68, p. 23-30.

Ritthidej G. C., Chomto P., Pummangura S. et Menasveta P. 1994. «Chitin and chitosan as disintegrants in paracetamol tablets». *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 20, p. 2109-2134.

Roberts G. A. F. 1992. *Chitin Chemistry*. London: Mac Millan Press.

Rosen H. B., Kohn J., Leong K. et Langer R. 1988. «Bioerodible polymers for controlled release systems». In *Controlled release systems: fabrication technology*, (Hsieh D. S. T., ed.), p. 83-110, CRC Press Inc.

- Ruan P., Gong Z. J. et Zhang Q. R. 2004. «Changes of plasma D-lactate, diamine oxidase and endotoxin in patients with liver cirrhosis». *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, vol. 3, p. 58-61.
- Rubinstein A., Nakar D. et Sintov A. 1992. «Colonic drug delivery: enhanced release of indomethacin from cross-linked chondroitin matrix in rat cecal content». *Pharm. Res.*, vol. 9, p. 276-278.
- Rubinstein A., Radai R., Ezra M., Pathak S. et Rokem J. M. 1993. «*In vitro* evaluation of calcium pectinate: a potential colon-specific drug delivery carrier». *Pharm. Res.*, vol. 10, p. 258-263.
- Rutgeerts P., Van Deventer S. et Schreiber S. 2003. «The expanding role of biological agents in the treatment of inflammatory bowel disease – focus on selective adhesion molecule inhibition». *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 17, p. 1435-1450.
- Rutter J. M. et Jones G. W. 1973. «Protection against enteric disease caused by *Escherichia coli* – a model for vaccination with a virulence determinant?». *Nature*, vol. 242, p. 531-532.
- Rutter J. M., Burrows M. R., Sellwood R. et Gibbons R. A. 1975. «A genetic basis for resistance to enteric disease caused by *E. coli*». *Nature*, vol. 257, p. 135-136.
- Sabnis S., Rege P. et Block L. H. 1997. «Use of chitosan in compressed tablets of diclofenac sodium: inhibition of drug release in an acidic environment». *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 2, p. 243-255.
- Saffran M., Bedra C., Kumar G. S. et Neckers D. C. 1988. «Vasopressin: a model for the study of effects of additives on the oral and rectal administration of peptide drugs». *J. Pharm. Sci.*, vol. 77, p. 33-38.
- Salminen T. A., Smith D. J., Jalkanen S. et Johnson M. S. 1998. «Structural model of the catalytic domain of an enzyme with cell adhesion activity: human vascular adhesion protein-1 (HVAP-1) D4 domain is an amine oxidase». *Protein Eng.*, vol. 11, p. 1195-1204.
- Sander L. E., Lorentz A., Sellge G., Coeffier M., Neipp M., Veres T., Frieling T., Meier P. N., Manns M. P. et Bischoff S. C. 2006. «Selective expression of histamine receptors H₁R, H₂R and H₄R, but not H₃R, in the human intestinal tract». *Gut*, vol. 55, p. 498-504.
- Sartor R. B. 1994. «Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiologic and clinical considerations». *Gastroenterology*, vol. 106, p. 533-539.

- Sartor R. B. 2004. «Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics». *Gastroenterology*, vol. 126, p. 1620-1633.
- Sattler J., Hafner D., Klotter H. J., Lorenz W. et Wagner P. K. 1988. «Food-induced histaminosis as an epidemiological problem: plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase (DAO)». *Agents Actions*, vol. 23, p. 361-365.
- Sattler J., Lorenz W., Kubo K., Schmal A., Sauer S. et Luben L. 1989. «Food-induced histaminosis under diamine oxidase (DAO) blockade in pigs: further evidence of the key role of elevated plasma histamine levels as demonstrated by successful prophylaxis with antihistamines». *Agents Actions*, vol. 27, p. 212-214.
- Schatz C., Domard A., Viton C., Pichot C. et Delair T. 2004. «Versatile and efficient formation of colloids of biopolymer-based polyelectrolyte complexes». *Biomacromolecules*, vol. 5, p. 1882-1892.
- Schmidt W. U., Sattler J., Hesterberg R., Roher H. D., Zoedler Th., Sitter H. et Lorenz W. 1990. «Human intestinal diamine oxydase (DAO) activity in Crohn's disease: a new marker for disease assessment?». *Agents Actions*, vol. 30, p. 267-270.
- Schultz M., Timmer A., Herfarth H. H., Sartor R. B., Vanderhoof J. A. et Rath H. C. 2004. «*Lactobacillus* GG in inducing and maintaining remission of Crohn's disease». *BMC Gastroenterology*, vol. 4, p. 5.
- Schwelberger H. G., Hittmair A. et Kohlwein S. D. 1998. «Analysis of tissue and subcellular localization of mammalian diamine oxidase by confocal laser scanning fluorescence microscopy». *Inflamm. Res.*, vol. 47, p. S60-S61.
- Sekine K., Kawashima T. et Hashimoto Y. 1994. «Comparison of the TNF- α levels induced by human-derived *Bifidobacterium longum* and rat-derived *Bifidobacterium animalis* in mouse peritoneal cells». *Bifidobacteria Microflora*, vol. 13, p. 79-89.
- Sen C. K. et Packer L. 1996. «Antioxidant and redox regulation of gene transcription». *FASEB J.*, vol. 10, p. 709-720.
- Shahidi F., Arachchi J. K. V. et Jeon Y. J. 1999. «Food applications of chitin and chitosans». *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 10, p. 37-51.
- Shibata N., Ohno T., Shimokawa T., Hu Z., Yoshikawa Y., Koga K., Murakami M. et Takada K. 2001. «Application of pressure-controlled colon delivery capsule to oral administration of glycyrrhizin in dogs». *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 53, p. 441-447.

- Sies H. 1997. «Oxidative stress: oxidants and antioxidants». *Exp. Physiol.*, vol. 82, p. 291-295.
- Singh R. et Pathak D. N. 1990. «Lipid peroxidation and glutathione peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase, catalase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in FeCl₃-induced epileptogenic foci in the rat brain». *Epilepsia*, vol. 31, p. 15-26.
- Sinha V. R. et Kumria R. 2003. «Microbially triggered drug delivery to the colon». *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 18, p. 3-18.
- Snoeck V., Huyghebaert N., Cox E., Vermeire A., Vancaeneghem S., Remon J. P. et Goddeeris B. M. 2003. «Enteric-coated pellets of F4 *fimbriae* for oral vaccination of suckling piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli* infections». *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 96, p. 219-227.
- Snoeck V., Cox E., Verdonck F., Joensu J. J. et Goddeeris B. M. 2004. «Influence of porcine intestinal pH and gastric digestion on antigenicity of F4 *fimbriae* for oral immunization». *Vet. Microbiol.*, vol. 98, p. 45-53.
- Sogias I. A., Williams A. C. et Khutoryanskiy V. V. 2008. «Why is chitosan mucoadhesive?». *Biomacromolecules*, vol. 9, p. 1837-1842.
- Sporn M. B. et Todaro G. J. 1980. «Autocrine secretion and malignant transformation of cells». *N. Engl. J. Med.*, vol. 303, p. 878-880.
- Steidler L., Hans W., Schotte L., Neiryneck S., Obermeier F., Falk W., Fiers W. et Remaut E. 2000. «Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10». *Science*, vol. 289, p. 1352-1355.
- Stein J., Scheuermann E. H., Yazdi R., Lembcke B. et Caspary W. F. 1994. «Reduced postheparin plasma diamine oxidase activity in patients with chronic renal failure». *Gastroenterology*, vol. 106, p. 236-239.
- Streatfield S. J., Sandkvist M., Sixma T. K., Bagdasarian M., Hol W. G. J. et Hirst T. R. 1992. «Intermolecular interactions between the A and B subunits of heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* promote holotoxin assembly and stability *in vivo*». *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 89, p. 12140-12144.
- Struszczyk H. 1987. «Microcrystalline chitosan. I: Preparation and properties of microcrystalline chitosan». *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 33, p. 177-189.
- Sugano M., Fujikawa T., Hiratsuji Y. et Hasegawa Y. 1978. «Hypocholesterolemic effects of chitosan in cholesterol-fed rats». *Nutr. Rep. Internat.*, vol. 18, p. 531-537.

- Suresh M. R., Ramakrishna S. et Adiga P. R. 1976. «Diamine oxidase of *Lathyrus sativus* seedlings». *Phytochemistry*, vol. 15, p. 483-485.
- Suresh M. R. et Adiga P. R. 1979. «Diamine oxidase of *Lathyrus sativus* seedlings. Purification and properties». *J. Biosci.*, vol. 1, p. 109-124.
- Tapia C., Escobar Z., Costa E., Sapag-Hagar J., Valenzuela F., Basualto C., Gai M. N. et Yazdani-Padram M. 2004. «Comparative studies on polyelectrolyte complexes and mixtures of chitosan – alginate and chitosan – carrageenan as prolonged diltiazem clorhydrate release systems». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 57, p. 65-75.
- Thacharodi D. et Rao K. P. 1995. «Development and *in vitro* evaluation of chitosan-based transdermal drug delivery systems for the controlled delivery of propranolol hydrochloride». *Biomaterials*, vol. 16, p. 145-148.
- Thanoo C., Sunny M. C. et Jayakrishnan A. 1992. «Cross-linked chitosan microspheres: preparation and evaluation as a matrix for the controlled release of pharmaceuticals». *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 44, p. 283-286.
- Thanou M., Verhoef J. C. et Junginger H. E. 2001. «Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives». *Adv. Drug Delivery Rev.*, vol. 52, p. 117-126.
- Theewes F. 1975. «Elementary osmotic pump». *J. Pharm. Sci.*, vol. 64, p. 1987-1991.
- Thompson J. S., Burnett D. A., Markin R. S. et Vaughan W. P. 1988. «Intestinal mucosa diamine oxydase activity reflects intestinal involvement in Crohn's disease». *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 83, p. 756-760.
- Thurn A. et Burchard W. 1985. «Heterogeneity in branching of amylopectin». *Carbohydr. Polym.*, vol. 5, p. 441-460.
- Tozaki H., Komoike J., Tada C., Maruyama T., Terabe A., Suzuki T., Yamamoto A. et Muranishi S. 1997. «Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: improvement of insulin absorption from the rat colon». *J. Pharm. Sci.*, vol. 86, p. 1016-1021.
- Tozaki H., Fujita T., Odoriba T., Terabe A., Suzuki T., Tanaka C., Okabe S., Shoo Muranishi S. et Yamamoto A. 1999. «Colon specific delivery of R68070, a new thromboxane synthase inhibitor, using chitosan capsules: therapeutic effects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats». *Life Sci.*, vol. 64, p. 1155-1162.
- Tsai G. J. et Su W. H. 1999. «Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*». *J. Food Protect.*, vol. 62, p. 239-243.

- Tuleu C., Adrieux C., Cherbuy C., Darcy-Vrillon B., Duee P. H. et Chaumeil J. C. 2001. «Colonic delivery of sodium butyrate via oral route: acrylic coating design of pellets and *in vivo* evaluation in rats». *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, vol. 23, p. 245-253.
- Tuovinen L., Peltonen S. et Jarvinen K. 2003. «Drug release from starch-acetate films». *J. Control. Rel.*, vol. 91, p. 345-354.
- Ueno H., Mori T. et Fujinaga T. 2001. «Topical formulations and wound healing applications of chitosan». *Adv. Drug Delivery Rev.*, vol. 52, p. 105-115.
- Van den Broeck W., Cox E. et Goddeeris B. M. 1999a. «Induction of immune responses in pigs following oral administration of purified F4 *fimbriae*». *Vaccine*, vol. 17, p. 2020-2029.
- Van den Broeck W., Cox E. et Goddeeris B. M. 1999b. «Receptor-dependent immune responses in pigs after oral immunization with F4 *fimbriae*». *Infect. Immun.*, vol. 67, p. 520-526.
- Van den Broeck W., Cox E., Oudega B. et Goddeeris B. M. 2000. «The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors». *Vet. Microbiol.*, vol. 71, p. 223-244.
- Van der Lubben I. M., Verhoef J. C., Borchard G. et Junginger H. E. 2001a. «Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery». *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 14, p. 201-207.
- Van der Lubben I. M., Konings F. A., Borchard G., Verhoef J. C. et Junginger H. E. 2001b. «*In vivo* uptake of chitosan microparticles by murine Peyer's patches: visualisation studies using confocal laser scanning microscopy and immunohistochemistry». *J. Drug Targeting*, vol. 9, p. 39-47.
- Vassallo M., Camilleri M., Phillips S. F., Brown M. L., Chapman N. J. et Thomforde G. M. 1992. «Transit through the proximal colon influences stool weight in the irritable bowel syndrome». *Gastroenterology*, vol. 102, p. 102-108.
- Veregin R. P., Fyfe C. A. et Marchessault R. H. 1987. «Investigation of the crystalline V amylase complexes by high-resolution ¹³C CP/MAS NMR Spectroscopy». *Macromolecules*, vol. 20, p. 3007-3012.
- Vervoort L., Van den Mooter G., Augustijns P., Busson R., Toppet S. et Kinget R. 1997. «Inulin hydrogels as carrier for colonic drug targeting: synthesis and characterization of methacrylated inulin and hydrogel formation». *Pharm. Res.*, vol. 14, p. 1730-1736.

- Vilivalam V. D., Illum L. et Iqbal K. 2000. «Starch capsules: an alternative system for oral drug delivery». *Pharm. Sci. Technol. Today*, vol. 3, p. 64-69.
- Vitini E., Alvarez S., Medina M., Medici M., de Budeguer M. V. et Perdigon G. 2000. «Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria». *Biocell.*, vol. 24, p. 223-232.
- Vlieg-Boerstra B. J., van der Hs, Oude Elberink J. N., Kluin-Nelemans J. C. et Dubois A. E. 2005. «Mastocytosis and adverse reactions to biogenic amines and histamine-releasing foods: what is the evidence?». *Neth. J. Med.*, vol. 63, p. 244-249.
- Wakerly Z., Fell J. T., Attwood D. et Parkins D. 1996. «Pectin/ethylcellulose film coating formulations for colonic drug delivery». *Pharm. Res.*, vol. 13, p. 1210-1212.
- Wantke F., Hemmer W., Focke M., Stackl W., Gotz M. et Jarisch R. 2001. «Are adverse effects of sildenafil also caused by inhibition of diamine oxidase?». *Urol. Int.*, vol. 67, p. 59-61.
- Wilce M. C., Dooley D. M., Freeman H. C., Guss J. M., Matsunami H., McIntire W. S., Ruggiero C. E., Tanizawa K. et Yamaguchi H. 1997. «Crystal structures of the copper-containing amine oxidase from *Arthrobacter globiformis* in the holo and apo forms: implications for the biogenesis of topa-quinone». *Biochemistry*, vol. 36, p. 16116-16133.
- Willemsen P. T. J. et de Graaf F. K. 1992. «Age and serotype dependent binding of K88 fimbriae to porcine intestinal receptors». *Microb. Pathol.*, vol. 12, p. 367-375.
- Winterkamp S., Weidenhiller M., Otte P., Stolper J., Schwab D., Hahn E. G. et Raithel M. 2002. «Urinary excretion of *N*-methylhistamine as a marker of disease activity in inflammatory bowel disease». *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 97, p. 3071-3077.
- Winzenburg G., Schmidt C., Fuchs S. et Kissel T. 2004. «Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery systems». *Adv. Drug Delivery Rev.*, vol. 56, p. 1453-1466.
- Wisniewski J. P., Rathbun E. A., Knox J. P. et Brewin N. J. 2000. «Involvement of diamine oxidase and peroxidase in insolubilization of the extracellular matrix: implications for pea nodule initiation by *Rhizobium leguminosarum*». *Mol. Plant-Microbe Interact.*, vol. 13, p. 413-420.
- Wu H. H. C. et Sarko A. 1978a. «The double-helical molecular structure of crystalline A-amylose». *Carbohydr. Res.*, vol. 61, p. 27-40.

Wu H. H. C. et Sarko A. 1978b. «The double-helical molecular structure of crystalline B-amylose». *Carbohydr. Res.*, vol. 61, p. 7-25.

Young A. H. 1984. «Fractionation of starch». In *Starch chemistry and technology*, (Wistler R. L., BeMiller J. N. et Paschall E. F., eds.), p. 249-274, 2nd edition, Orlando: Academic Press Inc.

Yu G., Liang J., He Z. et Sun M. 2006. «Quantum dot-mediated detection of γ -aminobutyric acid binding sites on the surface of living pollen protoplasts in tobacco». *Chem. Biol.*, vol. 13, p. 723-731.

Zambito Y. et Colo G. D. 2003. «Preparation and *in vitro* evaluation of chitosan matrices for colonic controlled drug delivery». *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, vol. 6, p. 274-281.

Zeoli L. T. et Kydonieus A. F. 1983. «Physical methods of controlled release». In *Controlled release technology. Bioengineering aspect*, (Das K. G., ed.), p. 61-120. New York: John Wiley & Sons.

Zhang H. et Neau S. H. 2002. «*In vitro* degradation of chitosan by bacterial enzymes from rat cecal and colonic contents». *Biomaterials*, vol. 23, p. 2761-2766.

U. S. Pharmacopeia National Formulary XXIV, NF XIX, United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD, 2000.